

Vergleichende Untersuchungen zur Funktion von Raver1 und Raver2

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Berenike Johanna Maria Henneberg

geb. Kleinhenz

aus Frankfurt am Main

1. Referentin: Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch
2. Referent: Prof. Dr. Hans-Henning Arnold
eingereicht am: 16. Januar 2006
mündliche Prüfung (Disputation) am: 27. April 2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Kleinhenz B, Fabienke M, Swiniarski S, Wittenmayer N, Kirsch J, Jockusch BM, Arnold HH, Illenberger S. Raver2, a new member of the hnRNP family. FEBS Lett. 2005 Aug 15;579 (20): 4254-8.

Tagungsbeiträge

Kleinhenz B, Fabienke M, Arnold HH, Jockusch BM, Illenberger S. (2004) Identification and initial characterisation of the hnRNP-like protein raver2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) März 2004, Berlin. European Journal of Cell Biology, Supplement 54, Vol. 83

Kleinhenz B, Fabienke M, Arnold HH, Jockusch BM, Illenberger S. (2004) Comparative analysis of the dual compartment proteins raver1 and raver2. FEBS special meeting on cytoskeletal dynamics: from cell biology to development and disease. 12-16 June, 2004, Helsinki, Finland

I INHALTSVERZEICHNIS

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	V
III	Zusammenfassung	VIII
1	Einleitung	1
1.1	„Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“ (hnRNPs)	1
1.2	Die Familie der traditionellen hnRNPs	2
1.3	Das „polypyrimidine tract binding protein“ PTB	4
1.3.1	Regulation des alternativen Spleißens durch PTB	7
1.4	Raver1	8
1.4.1	Zelluläre Lokalisation von Raver1	10
1.4.2	Liganden von Raver1	11
1.4.3	Funktion von Raver1 als Korepressor des alternativen Spleißens	13
1.4.4	Die Inaktivierung des Raver1-Gens in der Maus	14
1.5	Ziel der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	17
2.1.3	Bakterien	17
2.1.4	Hefen	18
2.1.5	Tierische Zelllinien	18
2.1.6	Vektoren	19
2.1.7	Oligodesoxynukleotide	19
2.1.8	cDNA-Banken	21
2.1.9	Antikörper	22
2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien	23
2.2.2	Transformation von Bakterien	24
2.2.3	Plasmid-Minipräparation	24

2.2.4	Plasmid-Midi-Präparation	24
2.2.5	Hefe-DNA-Präparation	25
2.2.6	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	25
2.2.7	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.9	DNA-Fragmentisolierung aus Agarose	26
2.2.10	Ligation	27
2.2.11	Hybridisierung von Oligodesoxynukleotiden zur Herstellung von Sequenzmarkern („tags“)	27
2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.13	Klonierung von PCR-Produkten	28
2.2.14	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung	28
2.3	Biochemische Methoden	29
2.3.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	29
2.3.1.1	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	30
2.3.1.2	Zellaufschluss und Proteinaufreinigung His-"tag"-markierter Proteine über Ni-NTA-Agarose-„Beads“	30
2.3.1.3	Umpuffern von Proteinen über Gelfiltration: PD10-Säulen	31
2.3.1.4	Ankonzentrieren von Proteinen	31
2.3.2	Proteinbestimmung	32
2.3.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.3.2.2	Densitometrische Proteinbestimmung	32
2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.3.3.1	Herstellung der Gele	33
2.3.3.2	Elektrophorese	33
2.3.3.3	NuPAGE-Gelelektrophorese	34
2.3.4	“Western Blot”	34
2.3.5	Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern	35
2.3.6	ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)	35
2.3.7	<i>In vitro</i> Transkription und Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden	36
2.3.8	"Dot Overlay"	36
2.3.9	„Far Western“	37
2.3.10	„Pulldown“	37

2.3.11	Das „Yeast Two-Hybrid” System	37
2.3.12	Herstellung von Zellextrakten	38
2.3.13	Herstellung von Embryoextrakten	39
2.3.14	Herstellung von Gewebeextrakten	39
2.3.15	Koimmunpräzipitation	39
2.3.16	„ <i>In vivo</i> Cross-Linking and Immunoprecipitation Method“ CLIP	40
2.3.16.1	UV-„Crosslink“ von Zellen	41
2.3.16.2	Vorbereitung der „Protein G Dynabeads“	42
2.3.16.3	CLIP-Immunpräzipitation	42
2.3.17	Protein-RNA UV-„Crosslink“	43
2.3.17.1	Auswertung der Protein-RNA UV-„Crosslinks“	44
2.3.18	Ribohomopolymer-Bindungstest	44
2.4	Zellbiologische Methoden	45
2.4.1	Kultivierung von Zellen	45
2.4.2	Kryokonservierung von Zellen	45
2.4.3	Differenzierung von Zellen	45
2.4.4	Isolierung primärer Maus Fibroblasten	46
2.4.4.1	Etablierung von Zelllinien aus primären Fibroblasten	46
2.4.5	Transfektion von Zellen	47
2.4.5.1	Calciumphosphat-Methode	47
2.4.5.2	Transfektion mit FuGene TM Transfektionsreagenz	47
2.4.6	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	48
2.4.7	Imunfluoreszenz	48
2.4.8	„Heterokaryon Assay“	49
2.4.9	„Spreading Assay“	49
2.4.10	„Wounding Assay“	50
2.4.11	Wachstumskurve	50
2.4.12	Präparation von Myofibrillen	51
2.4.12.1	Färbung von Myofibrillen	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Zellbiologische Untersuchungen an Raver1-defizienten Zellen und Geweben	52
3.1.1	Analyse Raver1-defizienter Gewebe	52
3.1.2	Zelluläre Analysen	56

3.1.2.1	Expressionsanalysen Raver1-assoziiierter Proteine in Wildtyp und Raver1-defizienten Zelllinien	57
3.1.2.2	Vergleichende Darstellung der Zellmorphologie von Wildtyp- und Raver1-defizienten Zelllinien	59
3.1.2.3	Vergleichende Analysen der Proliferation, Migration und Adhäsion von Wildtyp und Raver1-defizienten Zelllinien	61
3.2	Identifizierung und Charakterisierung von Raver2	66
3.2.1	Vergleichende Darstellung von Raver1 und Raver2	66
3.2.2	Charakterisierung des monoklonalen Raver2-Antikörpers 4C8	69
3.2.3	Expression und subzelluläre Lokalisation von endogenem Raver2	72
3.2.4	Identifizierung von PTB als Bindungspartner von Raver2	78
3.2.4.1	Nachweis einer direkten Interaktion <i>in vitro</i>	80
3.2.4.2	Assoziation von Raver2 und PTB in Zellen	85
3.3	Analysen zur RNA-Bindungseigenschaft von Raver1 und Raver2	87
3.3.1	Nachweis von Protein-RNA-Komplexen durch UV-„Crosslink“ und Immunpräzipitation (CLIP)	87
3.3.2	Untersuchungen zu Protein-RNA-Interaktionen <i>in vitro</i>	89
3.3.3	Der Einfluss von Raver1 und Raver2 auf die RNA-Bindung von PTB1	94
4	Diskussion	102
4.1	Der Verlust von Raver1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen	102
4.2	Raver2 weist Raver1 – ähnliche Eigenschaften auf	105
4.3	Raver1 und Raver2 – hnRNPs ohne RNA-Bindung?	108
4.4	Raver1 und Raver2 als mögliche Modulatoren der PTB-RNA-Bindung	111
4.5	Ausblick	115
5	Literaturverzeichnis	117

Danksagung

Lebenslauf

II ABKÜRZUNGEN

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-Sulfonsäure
Acc. #	„Genbank accession number“
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	„American type culture collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BiPro	Birkenprofilin
bp	Basenpaare
BSA	(engl.) Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	“complementary” DNA
CLIP	“UV-crosslinking and immunoprecipitation”
cm, mm, µm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DMEM	“Dulbecco’s modified eagle medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	“enhanced green fluorescent protein”
EGTA	Ethylenglycerol-bis-(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat-Säure
FCS	(engl.) Fötales Kälberserum

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Het	Heterozygot
HMW	„high molecular weight marker“
hnRNP	“heterogeneous nuclear ribonucleoprotein”
Hom	Homozygot
HRP	(engl.) Meerrettichperoxidase
HS	(engl.) Pferdeserum
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LRR	Leucinreiche Region
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampere
MCS	“multiple cloning site”
µCi	Mikrocurie
µmol, nmol, pmol	Mikromol, Nanomol, Pikomol
MOBS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MQ	Milli Q-Wasser
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MVT	„Metavinculin-Tail“
MW	(engl.) Molekulargewicht
NES	(engl.) Kernexportsequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NLS	(engl.) Kernlokalisationssequenz
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	(engl.) offenes Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Saline

PCR	(engl.) Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus [H^+]
pI	Isoelektrischer Punkt
PNC	(engl.) perinukleäres Kompartiment
PNK	Polynukleotid-Kinase
PTB	“Polypyrimidine tract binding protein”
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	(engl.) Umdrehungen pro Minute
RRM	(engl.) RNA- Erkennungsmotiv
rRNA	ribonuklein Ribonukelinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription mit anschließender PCR
SDS	(engl.) Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
snRNP	„small nuclear ribonucleoprotein”
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
Tween	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat-Lösung
üN	Über Nacht
U	Einheit der Enzymaktivität „Unit“
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

III ZUSAMMENFASSUNG

Raver1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das aufgrund der Existenz dreier „RNA recognition motifs“ (RRM) der Familie der „heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“ (hnRNP) zugeordnet wurde. Im Mausmodell hat die Inaktivierung des Raver1-Gens keinen Einfluss auf die Vitalität und Fertilität des Organismus.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Fibroblasten-Zelllinien aus Wildtyp, heterozygoten und Raver1-defizienten Mausembryonen generiert und charakterisiert. Weder in der Expression und subzellulären Lokalisation Raver1-assoziiierter Proteine noch in der generellen Morphologie waren signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien zu verzeichnen. Auch die Proliferation sowie elementare Aktin-abhängige Prozesse (Adhäsion, Ausbreitung und Migration) waren in den Raver1-defizienten Zellen unbeeinträchtigt. Somit kann der Verlust von Raver1 sowohl im Organismus als auch auf zellulärer Ebene toleriert oder durch funktionell redundante Proteine kompensiert werden.

Durch Datenbankrecherchen konnte ein Raver1-homologes Protein identifiziert werden, das Raver2 genannt wurde. Raver2 weist nicht nur in seiner Domänenstruktur sondern auch in ersten zellbiologischen und biochemischen Analysen viele Gemeinsamkeiten mit Raver1 auf. Beide Proteine sind vorwiegend im Zellkern lokalisiert und können im „Heterokaryon Assay“ zwischen Zellkern und Cytoplasma pendeln. Im Zellkern akkumulieren beide Raver-Proteine im „perinucleolar compartment“ (PNC) und liegen dort in Komplexen mit dem „polypyrimidine tract binding protein“ (PTB) vor. PTB konnte auch für Raver2 als direkter Bindungspartner identifiziert werden. Trotz ihrer RRM-s sind beide Raver-Proteine nicht in der Lage, unabhängig von anderen Faktoren direkt an RNA zu binden, können jedoch zumindest *in vitro* indirekt über PTB mit RNA assoziiert sein. Darüber hinaus konnten erste Hinweise gewonnen werden, dass beide Raver-Proteine die Bildung von PTB-RNA-Komplexen begünstigen. Diese Befunde stimmen mit der aufgestellten Hypothese überein, dass Raver1 und mögliche verwandte Proteine als Korepressoren PTB-vermittelter Spleißprozesse fungieren.

Eine vollständige Kompensation des Verlusts von Raver1 durch Raver2 ist ausgeschlossen, da Raver2 im Gegensatz zum ubiquitär exprimiertem Raver1, ein restriktives Expressionsmuster aufweist und während der Embryoentwicklung vorwiegend auf neuronale Strukturen konzentriert ist. Zukünftigen Analysen bleibt daher vorbehalten, ob der Verlust von Raver1 zu bisher unbekannten Defekten der Raver1-defizienten Mäuse führt.

1 EINLEITUNG

Die Übersetzung der in der DNA enthaltenen genetischen Information in Protein erfolgt über RNA-Moleküle. Während in Prokaryonten eine transkribierte RNA direkt als Matrice (messenger-RNA, mRNA) für die Translation fungiert, muss in eukaryontischen Zellen das primäre Transkript (prä-mRNA) prozessiert werden, bevor die reife mRNA den Zellkern verlassen kann.

Alle Prozesse der mRNA-Biogenese (Spleißen, Capping, Polyadenylierung, Editierung), des mRNA-Transports und der Translation werden primär durch RNA-bindende Proteine reguliert, die in Multiproteinkomplexen, so genannten Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP-Komplexe), an der RNA organisiert sind. RNP-Komplexe sind hoch dynamische Strukturen und variieren in ihrer molekularen Zusammensetzung in Abhängigkeit nicht nur des Zelltyps, sondern auch der zu prozessierenden RNA. Es wird angenommen, dass für jedes RNA-Transkript die molekulare Architektur der assoziierten RNP-Komplexe einzigartig ist und angepasst an die fortschreitende mRNA-Biogenese entsprechend moduliert wird.

1.1 „Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“ (hnRNPs)

Eine wichtige Gruppe regulatorischer RNA-bindender Proteine sind die „heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“ (hnRNPs). Hierunter werden zunächst alle Proteine zusammengefasst, die an prä-mRNA/RNA binden und diese durch einen oder mehrere Schritte der mRNA-Biogenese begleiten (siehe Abbildung 1.01). Sie sind jedoch kein konstanter Bestandteil eines Protein-RNA-Komplexes, wie beispielsweise Proteine ribosomaler Untereinheiten, oder von „small nuclear RNPs“ (snRNPs). Nach dieser Definition sind hnRNPs eine heterogene Gruppe, die sowohl klassische Spleißfaktoren (z. B. „U2 snRNP auxiliary factor“ (U2AF)) als auch so genannte traditionelle hnRNPs (z. B. hnRNP A1, hnRNP H) umfasst. Bereits während der Transkription werden hnRNPs an die polymerisierenden Transkripte rekrutiert und bleiben in wechselnder Zusammensetzung mit der RNA während der weiteren Prozessierung assoziiert (siehe Abbildung 1.01). Viele hnRNPs sind an Spleißvorgängen beteiligt und werden mit der Entfernung der intronischen Sequenzen ebenfalls aus den RNPs entlassen. Es zeigt sich jedoch, dass ein signifikanter Anteil von hnRNPs an der gereiften mRNA gebunden bleibt und mit dieser den Zellkern verlässt. Erst im Cytoplasma erfolgt die Dissoziation jener hnRNPs, die dann wieder in den Zellkern importiert werden. Diese Proteine werden auch als pendelnde („shuttling“) hnRNPs bezeichnet (Dreyfuss et al., 2002, Singh und Valcarcel, 2005).

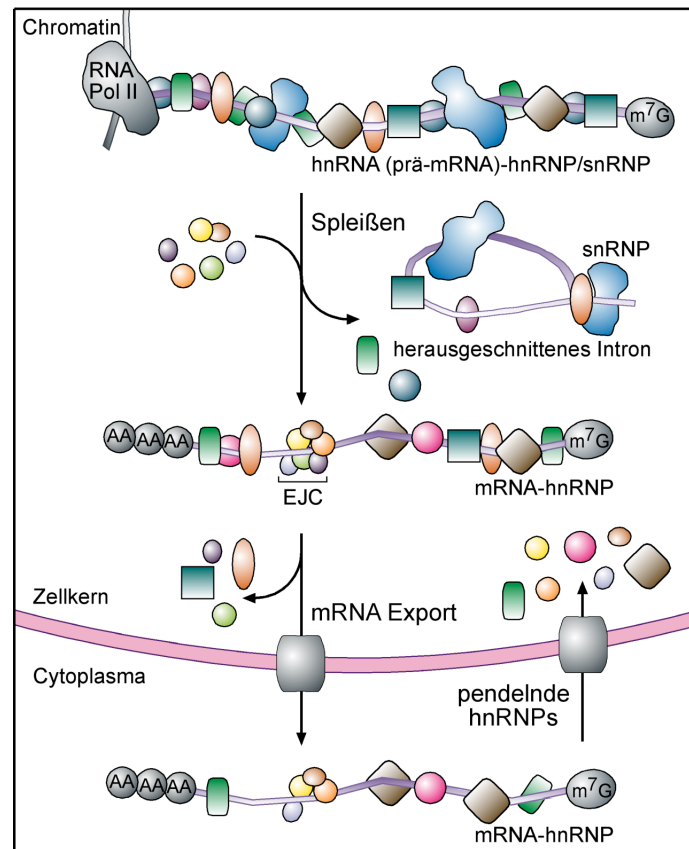


Abbildung 1.01: Biogenese der mRNA. Schematische Darstellung der transienten Interaktionen der Proteine eines RNP-Komplexes während der RNA-Prozessierung. EJC („exon-exon-junction complex“), RNA Pol II (RNA-Polymerase II), hnRNP („heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“), snRNP („small nuclear RNPs“), m7G (5'7-Methylguanosin-Kappe). (Modifiziert nach Dreyfuss et al., 2002).

1.2 Die Familie der traditionellen hnRNPs

Die Familie der traditionellen hnRNPs umfasst derzeit etwa 30 Mitglieder. Sie sind häufig ubiquitär exprimiert und in zentrale Schritte der mRNA-Biogenese involviert (Singh und Valcarcel, 2005).

Ein wesentliches Charakteristikum sind die oftmals in Mehrzahl auftretenden RNA-Bindungsdomänen: das RNA-Erkennungsmotiv („RNA recognition motif“, RRM), die hnRNP K-homologe Domäne (KH-Domäne) und die RGG (Arg-Gly-Gly) Box (Burd und Dreyfuss, 1994, Krecic und Swanson, 1999). Wie bei vielen anderen RNA-bindenden Proteinen stellen RRM die häufigste RNA-Bindungsdomäne der hnRNPs dar. Sie umfassen etwa 80-90 Aminosäuren und sind zu einer charakteristischen dreidimensionalen Struktur gefaltet ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$). Die RRM beinhalten konservierte RNP-Motive, die aus sechs (RNP-1) oder acht (RNP-2) Aminosäuren bestehen (Siomi und Dreyfuss, 1997, Maris et al., 2005). Zusätzlich zu

den RNA-Bindungsdomänen besitzen hnRNPs häufig Hilfsdomänen, die glycin- und argininreich sind und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, die Proteinlokalisierung bestimmen oder die RNA-Bindungsaktivität modulieren. Auch die RRM selbst kann neben der RNA-Bindung die Funktionen der Hilfsdomänen übermitteln (Perez et al., 1997a, Chou et al., 2000).

Ursprünglich wurde angenommen, dass traditionelle hnRNPs vor allem das alternative Spleißen regulieren, während konstitutive Spleißprozesse unter der Kontrolle von SR-Proteinen (serin-argininreiche Proteine) stehen. Diese klassische Einteilung ist inzwischen hinfällig geworden. Vielmehr übernehmen Mitglieder beider Familien synergistische oder antagonistische Aufgaben während der mRNA-Biogenese. Die Mitglieder der hnRNP-Familie sind an einer Vielzahl nukleärer Prozesse beteiligt, wobei die meisten Proteine in mehr als einen Prozess der mRNA-Biogenese integriert sind. So ist z. B. hnRNP C1/C2 neben dem Spleißen auch an der mRNA Stabilitätskontrolle im Zellkern beteiligt (Rajagopalan et al., 1998) und hnRNP U übernimmt Funktionen in der Regulation und Kontrolle der Transkription sowie in der nukleären Retention von RNA-Transkripten im Zellkern (Dreyfuss et al., 1993, Kukalev et al., 2005). Außer an der mRNA-Biogenese sind einige Mitglieder auch an weiteren Prozessen im Zellkern beteiligt, wie beispielsweise am Erhalt der Telomerlänge (hnRNP A1; LaBranche et al., 1998) und der Rekombination von Immunglobulin-kodierenden Genen (Dempsey et al., 1999). Somit dürfen hnRNPs nicht nur als reine Verpackungsproteine der prä-mRNA und mRNA angesehen werden (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1992). Obwohl die meisten hnRNPs im zellulärem Gleichgewicht („steady state“) überwiegend im Zellkern lokalisiert sind, pendeln sie doch beständig zwischen Zellkern und Cytoplasma. Rein kernständige (hnRNPC1/C2 und hnRNP U; Nakielny und Dreyfuss, 1997, Shyu und Wilkinson, 2000) oder überwiegend cytoplasmatisch lokalisierte hnRNPs (Hu-Proteine; Kasashima et al., 1999, Antic und Keene, 1998) bilden eher die Ausnahme. Pendelnde hnRNPs sind oft am Export der reifen mRNA beteiligt, übernehmen jedoch zum Teil auch cytoplasmatische Funktionen, beispielsweise bei der spezifischen Lokalisation von mRNA oder der Translationskontrolle (Antic und Keene, 1998). So konnte für HuR gezeigt werden, dass es neben einer Beteiligung am mRNA-Export auch essenzielle Funktionen bei der Stabilitätskontrolle und damit der Umsetzung der mRNA im Cytoplasma übernimmt (Keene, 1999).

1.3 Das „polypyrimidine tract binding protein“ PTB

Eines der am Umfassendsten charakterisierten Mitglieder der Familie der traditionellen hnRNPs ist das „polypyrimidine tract binding protein“ (PTB), welches auch als „hnRNP I“ bezeichnet wird. Das 57 kDa große Protein, wurde ursprünglich als ein Faktor entdeckt, welcher an uracilreiche Regionen intronischer Sequenzen bindet (Garcia-Blanco et al., 1989).

PTB enthält vier RRMs, die über die Gesamtsequenz verteilt sind, wobei RRM1 und RRM2 von RRM3 und RRM4 durch eine „Linker“-Region voneinander getrennt sind (siehe Abbildung 1.02). Alternative Spleißvorgänge innerhalb dieser Region führen zur Entstehung verschiedener Spleißvarianten. Durch Überspringen von Exon 9 entsteht die in Abbildung 1.02 dargestellte kürzeste Isoform, PTB1. Bei Inkorporation von Exon 9, aber Auswahl unterschiedlicher 3'Spleißpositionen werden PTB2 und PTB4 generiert (Wollerton et al., 2001). Diese Spleißvarianten sind in vielen Zelltypen exprimiert, so dass meist mehrere Spleißvarianten gleichzeitig vorliegen.

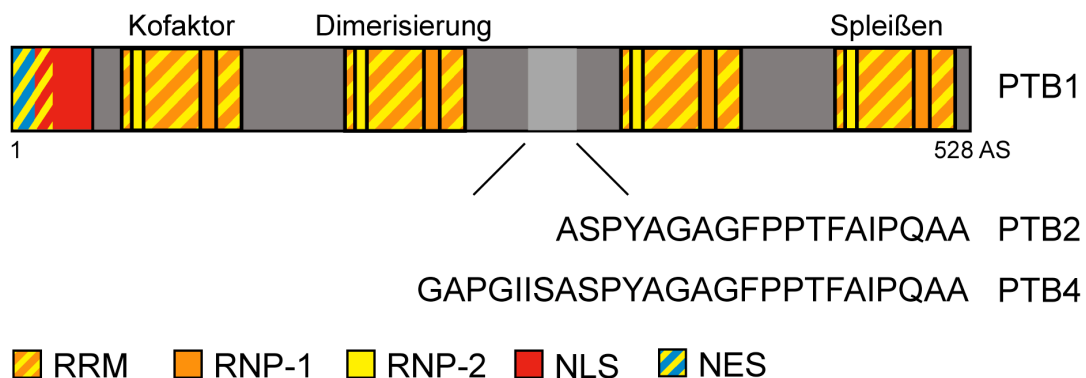


Abbildung 1.02: Schematische Darstellung von PTB. Anhand der Primärsequenz von PTB ist die Anordnung der vier RRMs (gelb-orange gestreift), mit den konservierten RNP-2- (gelb) und RNP-1-Motiven (orange) dargestellt. Im N-Terminus ist die mit der NLS (rot) überlappende NES (blau-gelb gestreift) abgebildet. Die hellgrau hervorgehobene „Linker“-Region stellt den Bereich des Proteins dar, in dem durch alternatives Spleißen die drei PTB-Isoformen entstehen. Die zusätzlichen Funktionen, die die vier RRMs neben der RNA-Bindung übernehmen können (Bindung eines Kofaktors, Dimerisierung und Spleißen), sind über dem Proteindiagramm angegeben.

Neuste Untersuchungen zeigen, dass alle vier RRM von PTB prinzipiell RNA binden können (Oberstrass et al., 2005). Allerdings zeigen Deletionskonstrukte mit jeweils nur einer RRM *in vitro* keine RNA-Bindung und Deletionskonstrukte, die eine Kombination von mindestens zwei RRM beinhalten, weisen eine im Vergleich zum gesamten Protein schwächere RNA-Bindung

auf (Perez et al., 1997a). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die RRM2 unterschiedliche Schwerpunkte in ihrer Funktion haben. So wird beispielsweise die Dimerisierung über die RRM2 vermittelt (Oh et al., 1998), die RRM1 übernimmt Funktionen bei der Kernlokalisation von PTB (Perez et al., 1997b, Huang et al., 1997) sowie bei der Bindung eines postulierten bisher unbekannten Kofaktors (Oh et al., 1998). Für die spezifische Spleißaktivität ist die RRM4 essenziell (Liu et al., 2002). Anhand der verschiedenen Analysen unterschiedlicher Deletionskonstrukte wird deutlich, dass die physiologische Funktion von PTB nur durch das Zusammenspiel aller vier RRM2 entsteht.

Wie die meisten Mitglieder der hnRNP-Familie ist PTB in eukaryontischen Zellen überwiegend im Zellkern lokalisiert. Dort ist es, unter Ausschluss der Nukleoli, meist diffus im Nukleoplasma verteilt. In transformierten Zellen ist häufig eine Anreicherung in so genannten „perinucleolar compartment“ (PNC) zu beobachten (Ghetti et al., 1992, Matera et al., 1995, Huang et al., 1997). Die PNC sind distinkte Strukturen, die in der Peripherie von Nukleoli lokalisiert sind und eine hohe zelltyp- und zellzyklus abhängige Dynamik aufweisen. Außer PTB konnten bisher in diesen Strukturen weitere hnRNPs sowie Transkripte kleinerer RNAs nachgewiesen werden (Huang et al., 1998). Ihre genaue zelluläre Funktion bleibt jedoch zu klären.

Als klassisches Mitglied der hnRNP-Familie ist PTB in der Lage, zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln. Die Kernlokalisation von PTB wird durch eine zweigeteilte Kernlokalisationssequenz („nuclear localisation signal“, NLS) am N-Terminus vermittelt (Romanelli et al., 1997). Die NLS liegt innerhalb der ersten 60 Aminosäuren des Proteins und besteht aus zwei kurzen Abfolgen basischer Aminosäuren, die durch eine „Spacer“-Region voneinander getrennt sind. In Deletionsversuchen und Studien zur Neukombination von PTB-Domänen wurde deutlich, dass diese NLS nur in Kombination mit der RRM1 zur überwiegenden Kernlokalisation von PTB führt (Huang et al., 1997, Perez et al., 1997b). Für den Export von PTB aus dem Zellkern ist ein ebenfalls im N-Terminus gelegener exportrelevanter Bereich („nuclear export signal“, NES), der mit der NLS überlappt, im Zusammenspiel mit RRM1 und RRM2 wichtig, wobei der Export von PTB unabhängig vom RNA-Export ist (Romanelli et al., 2000, Kamath et al., 2001, Li und Yen, 2002). Die Regulation des nukleocytoplasmatischen Transports von PTB erfolgt über dessen Phosphorylierung. Die Phosphorylierung eines in der NLS gelegenen Serinrests (S16) durch die 3',5'-cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) ist für den Export essenziell und führt zu einer Anreicherung von PTB im Cytoplasma (Xie et al., 2003).

PTB ist in vielen Schritten der prä-mRNA Prozessierung involviert und übernimmt neben der Regulation des alternativen Spleißens unterschiedliche Funktionen. Im Zellkern ist PTB auch an der Regulation der prä-mRNA-Polyadenylierung beteiligt (Lou et al., 1996), während es im

Cytoplasma an der Lokalisation von mRNA in *Xenopus* Oocyten und an der Translationskontrolle viraler RNAs beteiligt ist (Borman et al., 1993, Cote et al., 1999, Pilipenko et al., 2001). Diese Daten lassen vermuten, dass PTB eine Brückenfunktion zwischen RNA und zellulären Faktoren an den Ribosomen übernehmen kann (Kim und Dreyfuss, 2001).

Die am besten charakterisierte Funktion von PTB ist jedoch nach wie vor die eines Repressors des alternativen Spleißens. PTB bindet direkt und mit hoher Affinität an intronische Repressor-Elemente („splicing silencer“) die aus polypyrimidinreichen Sequenzen („polypyrimidine tracts“) bestehen. Diese polypyrimidinreichen Sequenzen beinhalten multiple Kopien der PTB-Bindungsmotive UCUU, CUCUCU und UUCUCU (Liu et al., 2002). Durch die Bindung von PTB an diese, ein Exon flankierenden regulatorischen Sequenzen findet eine Repression des Exons statt. Auf diese Weise ist PTB an der transkriptionellen Regulation verschiedener Gene wie beispielsweise für α -Tropomyosin (Gooding et al., 1994, 1998), β -Tropomyosin (Mulligan et al., 1992), α -Actinin (Southby et al., 1999), c-src (Chan und Black, 1997), GABA_A Rezeptor $\gamma 2$ Untereinheit (Ashiya und Grabowski, 1997), FGF („fibroblast growth factor“) Rezeptoren 1 und 2 (Jin et al., 2000, Carstens et al., 2000) und sich selbst beteiligt (Wagner und Gracia-Blanco, 2001).

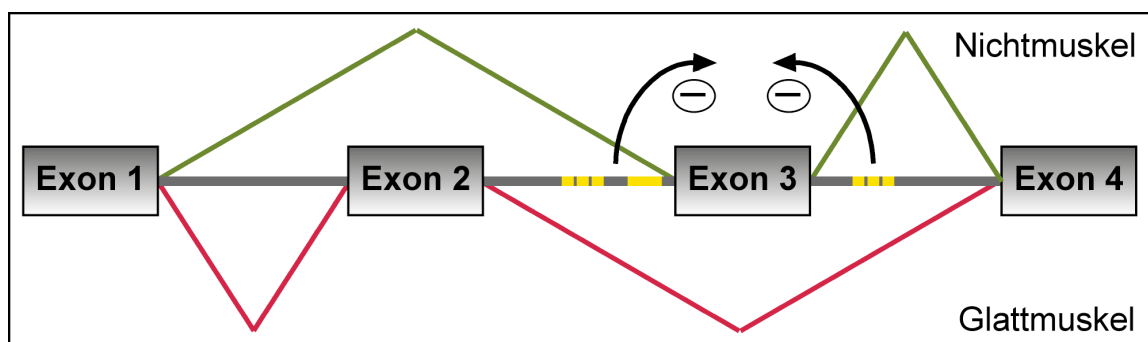


Abbildung 1.03: PTB-vermittelte Repression von Exon 3 des α -Tropomyosins führt zu glattmuskelspezifischem Spleißen. In der schematischen Darstellung des alternativen Spleißens sind die ersten vier Exone des α -Tropomyosins als graue Kästen dargestellt. Die grünen Linien oberhalb zeigen das Spleißverhalten, das zur Produktion des Nichtmuskel- α -Tropomyosin führt, wobei Exon 2 reprimiert wird. Die unterhalb der Exone hervorgehobenen roten Linien, zeigen ein alternatives Spleißen, das zur Entstehung der glattmuskelspezifischen α -Tropomyosin-Isoform führt, wobei Exon 3 ausgespleißt wird. Die Exon 3 flankierenden polypyrimidinreichen Sequenzen sind in gelb eingezeichnet und kennzeichnen die Bereiche, an die PTB bindet. (Modifiziert nach Valcarcel und Gebauer, 1997).

Die Wirkungsweise von PTB als Repressor des alternativen Spleißens ist exemplarisch für das α -Tropomyosin dargestellt (siehe Abbildung 1.03). Durch alternative Inkorporation von

Exon 2 oder Exon 3 entsteht die nichtmuskel- (Exon 3) oder die glattemuskelspezifische (Exon 2) Isoform. In Glattemuskelnzellen bindet PTB an polypyrimidinreiche Sequenzen, die Exon 3 flankieren, wodurch das Einspleißen diese Exons in die mRNA verhindert wird. Erst diese PTB-abhängige Repression ermöglicht die Inkorporation von Exon 2 und die Bildung von glattemuskelspezifischem α -Tropomyosin. In anderen Zelltypen fehlt diese Repression und Exon 3 wird aufgrund stärkerer Spleißsignale anstelle von Exon 2 in die mRNA integriert (Gooding et al., 1994, 1998).

1.3.1 Regulation des alternativen Spleißens durch PTB

Durch den Mechanismus des alternativen Spleißens kann der Organismus von nur einem Gen eine Vielzahl von Isoformen generieren. Dies geschieht, indem entweder unterschiedliche Kombinationen bei der Auswahl der Spleißpositionen gewählt werden oder verschiedene Exone selektioniert werden. Die durch das alternative Spleißen generierten Isoformen können entweder unterschiedliche Funktionen übernehmen oder entstehen gewebespezifisch, wie es bereits für α -Tropomyosin gezeigt wurde. Für diese Spezifität sind positive oder negative Regulatoren erforderlich.

PTB ist ein solcher potenter negativer Regulator des alternativen Spleißens. Da PTB jedoch ubiquitär exprimiert ist, muss es Regulationsmechanismen geben, die die PTB-vermittelte Repression spezifischer Exonsequenzen zelltypspezifisch regulieren. Generell sind für die Regulation des alternativen Spleißens cis-aktive regulatorische Elemente in der prä-mRNA essenziell. Durch die Bindung von trans-aktiven regulatorischen Faktoren wird die Assoziation des Spleißosoms an diesen Stellen, positiv oder negativ, durch die generell synergistische und antagonistische Wirkung verschiedener Proteine beeinflusst. So blockiert die Bindung von PTB an polypyrimidinreiche Sequenzen die Bindung von U2AF. Die Bindung von U2AF, einem Hilfsfaktor für U2 snRNP, an den „Branchpoint“ ist essenziell für die Rekrutierung von U2 snRNP und die Einleitung des Spleißens. Wenn U2AF nicht mehr an die prä-mRNA bindet, findet an dieser Spleißposition die Ansammlung des Spleißosoms nicht statt und das entsprechende Exon wird reprimiert (Singh et al., 1995, Chou et al., 2000).

Damit PTB jedoch das alternative Spleißen bestimmter Gene auf eine gewebespezifische Art und Weise regulieren kann, muss seine Aktivität in den unterschiedlichen Zelltypen und Geweben spezifisch reguliert werden. Eine einfache Möglichkeit hierzu wäre die Regulation über die PTB-Expressionsstärke (Valcarcel und Gebauer, 1997). So könnte der PTB-Expressionsspiegel relativ zu anderen Spleißfaktoren reguliert werden, so dass entweder die Antagonisten oder PTB stärker

exprimiert werden. Damit würde das Verhältnis der um dieselben RNA-Sequenzen konkurrierenden Proteine entscheiden, an welchen Positionen ein bestimmtes Transkript gespleißt wird. Tatsächlich konnte ein geringerer Expressionsspiegel von PTB im Gehirn und Skelettmuskel der Maus nachgewiesen werden (Markovtsov et al., 2000, Lilleväli et al., 2001). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die gewebespezifische Exon-Inkorporation hoch sensitiv gegenüber den vorherrschenden PTB-Konzentrationen ist (Ashiya und Grabowski, 1997, Chan und Black, 1997, Southby et al., 1999, Chou et al., 2000).

Eine weitere alternative Regulationsmöglichkeit basiert auf homologen Proteinen, die gewebespezifisch exprimiert werden. So konnte sowohl ein glattmuskel- als auch ein gehirnspezifisches PTB-homologes Protein identifiziert werden (Gooding et al., 2003, Markovtsov et al., 2000). Das als „brain“-PTB (brPTB) identifizierte Protein besitzt eine hohe Homologie zu PTB und wird in Neuronen und Glia-Zellen des Gehirns stark exprimiert (Polydorides et al., 2000). BrPTB bindet an die gleichen polypyrimidinreichen intronischen Sequenzen wie PTB. Bei den bisher untersuchten Genen, die einem PTB-reguliertem Spleißen unterliegen, wirkt brPTB ebenfalls als ein Regulator, der die PTB vermittelte Repression unterstützt. Jedoch besitzt brPTB eine deutlich schwächere Repressoraktivität als PTB (Markovtsov et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass durch die geringe Repressoraktivität von brPTB die Entstehung neuronaler Spleißkomplexe gefördert wird (Singh und Valcarcel, 2005).

1.4 Raver1

Raver1 wurde ursprünglich in einem „Yeast Two-Hybrid Screen“ als Ligand der Metavinculin-Schwanzdomäne identifiziert (Hüttelmaier et al., 2001). Vergleichende Datenbank-Analysen zeigen, dass Raver1 ein nur in Vertebraten exprimiertes Protein ist und die Primärsequenz von Raver1 aus der Maus 748 Aminosäuren umfasst. Das daraus resultierende Protein von 80 kDa besitzt im N-terminalen Bereich drei RRM, mit konservierten RNP-Motiven, RNP-1 und RNP-2. Anhand computergestützter Analysen konnten ebenso zwei Sequenzbereiche, die mögliche NLS-Motive darstellen, identifiziert werden. Diese sind zum einen eine N-terminale bipartite basische NLS (Aminosäuren 45-60, Konsensus-Sequenz RKR...₁₀RRK) und zum anderen eine am äußersten C-Terminus befindliche kurze Abfolge basischer Aminosäuren, welche alle Merkmale einer klassischen NLS aufweisen (Aminosäuren 743-746, Konsensus-Sequenz, KRKR). Darüber hinaus konnte eine leucinreiche Region identifiziert werden (Aminosäuren 339-400), die eine mögliche Kernexportsequenz (NES) darstellt (siehe Abbildung 1.04).

In einem Sequenzvergleich der RNP-Motive der drei RRMs von Raver1 mit RNP-Motiven von weiteren hnRNPs weisen HuR („embryonic lethal abnormal visual system (ELAV)-like protein“) und „PTB-associated splicing factor“ (PSF), zwei Mitgliedern der klassischen hnRNP-Familie, die höchsten Homologien auf. Die im Vergleich zum Konsensus-Motiv der RNP-Motive der hnRNP-Familie auftretenden Substitutionen in den RNP-Motiven von Raver1 betreffen die Aminosäurepositionen, die bedeutend für die Nukleotidbindung sein könnten (Maris et al., 2005). Die RNP-Motive von HuR und PSF weisen jedoch ebenfalls Substitutionen in diesen Positionen auf, so dass man hieraus kein Ausschlusskriterium für die Familienzugehörigkeit ableiten kann. Raver1 kann daher in die Familie der hnRNPs eingeordnet werden (siehe Abbildung 1.04).

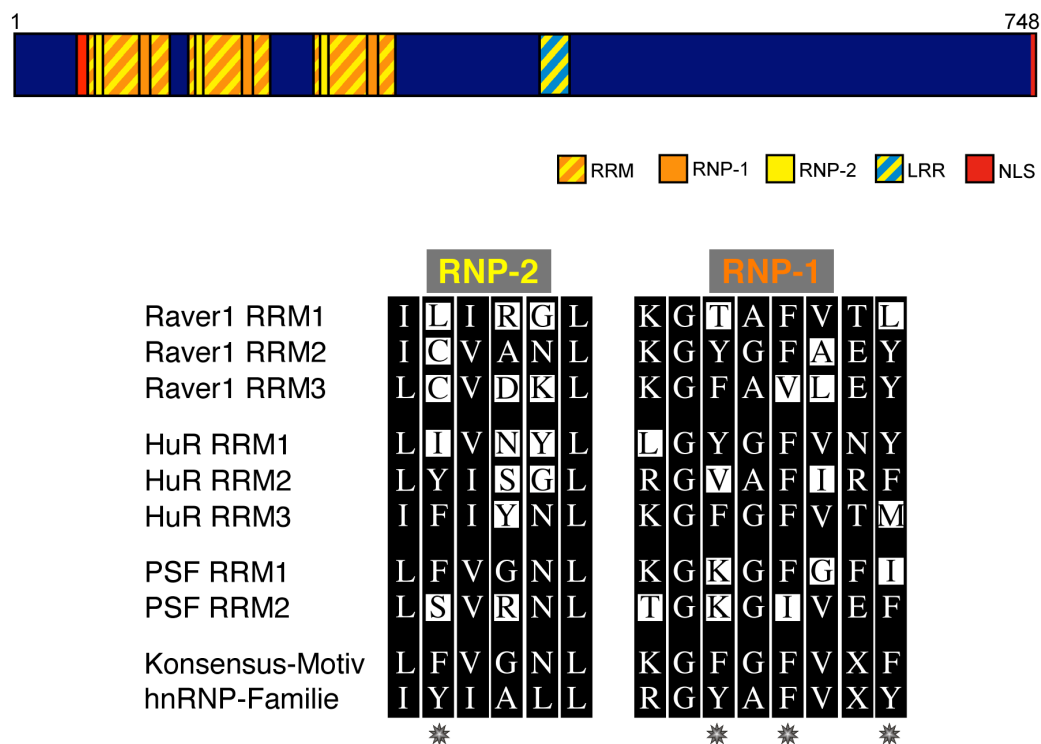


Abbildung 1.04: Raver1-Proteindiagramm und Sequenzvergleich der RNP-Motive. Oben: Darstellung der wichtigsten Domänen der Raver1-Primärsequenz: die zweigeteilten RRMs (gelb-orange gestreift) sind mit den RNP-1- (gelb) und RNP-2-Motiven (orange) gezeigt. Die beiden vorhergesagten NLS-Motive sind rot und die leucinreiche Region (LRR) blau-gelb markiert (modifiziert nach Hüttelmaier et al., 2001). Unten: Der Sequenzvergleich der RNP-Motive von Raver1 im Vergleich zum Konsensus-Motiv der hnRNP-Familie sowie zu HuR und PSF. Die mit Sternchen markierten Positionen stellen aromatische Aminosäurereste dar, die für die Nukleotidbindung von Bedeutung sind (Maris et al., 2005).

1.4.1 Zelluläre Lokalisation von Raver1

Raver1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das bereits in frühen Embryonalstadien der Maus nachgewiesen werden kann. Auch alle bisher untersuchten Mausgewebe und Vertebraten-Zelllinien exprimieren Raver1, allerdings variiert die jeweilige Expressionsstärke (Hüttelmaier et al., 2001). In den meisten Zelltypen ist Raver1 überwiegend im Zellkern lokalisiert, kann biochemisch jedoch auch zu einem geringen Anteil im Cytoplasma nachgewiesen werden (Diplomarbeit K. Falley, 2004). Im Zellkern weist Raver1 ein ähnliches Verteilungsmuster wie PTB auf und kolokalisiert mit diesem in den PNC. Größtenteils ist es aber diffus im Nukleoplasma verteilt (Hüttelmaier et al., 2001).

Wie auch PTB und viele der traditionellen hnRNPs besitzt Raver1 die Fähigkeit, zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln. Die genauen regulatorischen Mechanismen der nukleocytoplasmatischen Translokation sind noch nicht geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich zumindest bei der C-terminalen NLS um ein echtes Kernimport-Signal handelt. Allerdings gibt es weitere, in der C-terminalen Hälfte des Proteins gelegene Sequenzen, die für den Import relevant sind und unabhängig von beiden NLS den Import vermitteln können (Diplomarbeit K. Falley, 2004).

Exportsequenzen sind im Gegensatz zu Importsequenzen nicht sehr hoch konserviert und daher schwer zu identifizieren. Die in der Erstbeschreibung (Hüttelmaier et al., 2001) vorgeschlagene NES (Aminosäuren 376-385) konnte bisher nicht als NES bestätigt werden. Exportrelevante Regionen konnten bisher im N-Terminus (Aminosäuren 1-63) und im Bereich der Aminosäuren 512-527 festgestellt werden (Diplomarbeit K. Falley, 2004). Der Export von Raver1 ist nach ersten Untersuchungen im „Heterokaryon Assay“ (Michael et al., 1995, Fan und Seitz, 1998) CRM1(Exportin1)-unabhängig, da der Einsatz von Leptomycin B, das an den Transportrezeptor bindet und ihn so inhibiert, keinen Einfluss auf die Pendelaktivität von Raver1 hat (S. Illenberger, unveröffentlicht).

In einigen untersuchten Zellsystemen und Geweben konnte in fluoreszenzmikroskopischen Studien eine Akkumulation von Raver1 im Cytoplasma beobachtet werden. Dies ist vor allem im Muskelgewebe und differenzierten Myoblasten zu beobachten. Während der morphologischen Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben erfährt Raver1 eine signifikante Translokation aus dem Zellkern in das Cytoplasma. In ausdifferenzierten Zellen und in der Skelettmuskulatur ist Raver1 in einem periodischen Streifenmuster konzentriert, das mit der I-Z-I-Region des Sarkomeres korreliert. Aufgrund der bisher identifizierten cytoplasmatischen Liganden von Raver1 (siehe Kapitel 1.4.2) ist anzunehmen, dass Raver1 mit denjenigen sarkomeren Strukturen

assoziiert ist, die die Mikrofilamente an der Membran (Costamere) oder an der Z-Linie verankern (Hüttelmaier et al., 2001, Dissertation A. Zieseniß, 2005).

1.4.2 Liganden von Raver1

□

Als zelluläre Liganden von Raver1 konnten bisher folgende Proteine identifiziert werden: PTB, Vinculin/Metavinculin, α -Actinin (Hüttelmaier et al., 2001) und erst kürzlich auch Aktin (Dissertation A. Zieseniß, 2005). Die jeweiligen Interaktionsbereiche von Raver1 sind in Abbildung 1.05 dargestellt.

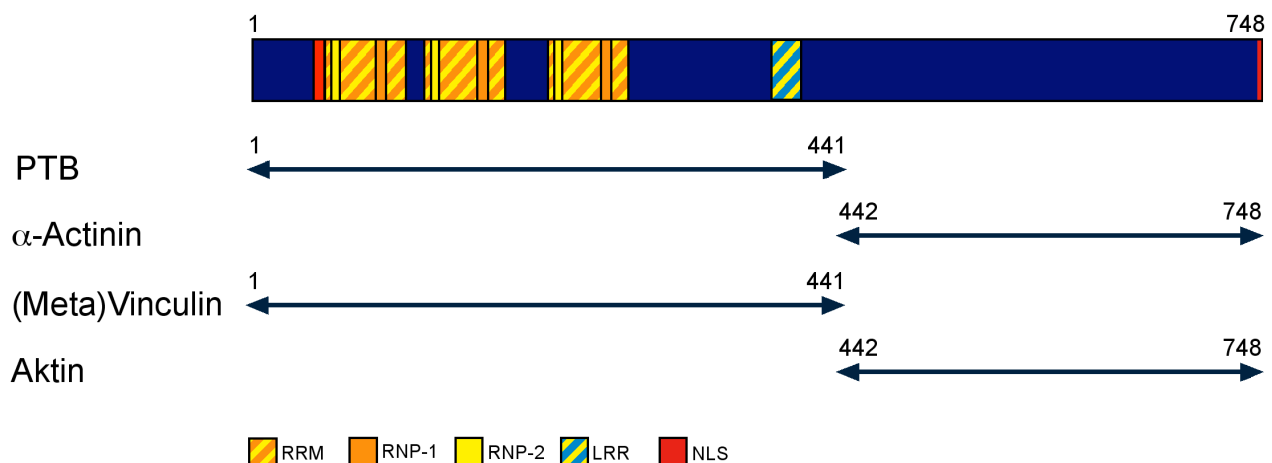


Abbildung 1.05: Bindungsregionen der Raver1-Liganden. Die Primärsequenz von Raver1 ist oben mit den drei RRM-Motiven (gelb-orange gestreift) und den konservierten RNP-Motiven, RNP-1 (orange) und RNP-2 (gelb) abgebildet. Die NLS-Motive sind rot und die leucinreiche Region (LRR) blau-gelb markiert (modifiziert nach Hüttelmaier et al., 2001). Die Bindungsregionen der Liganden sind mit Pfeilen unterhalb des Diagramms dargestellt. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz.

Im Zellkern kolokalisiert Raver1 mit PTB. Biochemische Analysen mit gereinigtem Protein zeigen, dass es eine direkte Interaktion gibt. Als Bindungsbereich in Raver1 wurden ein N-terminales Fragment (Aminosäuren 1-442; Hüttelmaier et al., 2001) und die Aminosäuren 307-401 (Gromak et al., 2003) identifiziert. In Immunpräzipitations-Experimenten kopräzipitieren beide Proteine miteinander. Diese Komplexbildung erfolgt RNA-unabhängig (Hüttelmaier et al., 2001). Auf eine mögliche zelluläre Funktion der Raver1-PTB-Interaktion wird im Kapitel 1.4.3 näher eingegangen.

Die bisher bekannten cytoplasmatischen Bindungspartner von Raver1 lassen darüber hinaus eine Assoziation des Proteins mit dem Mikrofilamentsystem vermuten:

Vinculin ist ein ubiquitär exprimiertes, hoch konserviertes Strukturprotein. In tierischen Zellen ist Vinculin ein zentraler Bestandteil von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen und ist dort mit cytoplasmatischen Proteinkomplexen assoziiert, die der Verankerung der Mikrofilamente an der Plasmamembran dienen (Geiger et al., 1987). Neben Vinculin existiert im Muskelgewebe mit Metavinculin eine zweite Isoform, die durch alternatives Spleißen von Exon 19 entsteht. Metavinculin besitzt distinkte biochemische Eigenschaften, die auf einen spezifischen Beitrag in muskulären Adhärenzverbindungen schließen lassen (Witt et al., 2004). Zudem gibt es Hinweise auf eine essenzielle Rolle von Metavinculin in der strukturellen Integrität und Funktion des Herzens (Olson et al., 2002, Zemljic-Harpf et al., 2004). Beide Proteine gliedern sich in eine N-terminale, globuläre Kopfdomäne und eine C-terminale Schwanzdomäne, die über eine prolinreiche Region verbunden sind (Bendori et al., 1989, Price et al., 1989). Raver1 wurde ursprünglich in einem "Yeast Two-Hybrid Screen" als Ligand der Metavinculin-Schwanzdomäne identifiziert und zeigt eine höhere Bindungsaffinität zur ihr als zu der ebenfalls untersuchten Vinculin-Schwanzdomäne (Hüttelmaier et al., 2001). Die Kolokalisation von Raver1 mit Vinculin wurde für den Z-Scheiben-Bereich der Myofibrillen der quergestreiften Muskulatur gezeigt (Hüttelmaier et al., 2001).

α -Actinine sind eine hochkonservierte Familie aktinbindender Proteine die Aktinfilamente vernetzen. Für Säuger- α -Actinine konnte eine funktionelle Diversität der verschiedenen α -Actinin-Isoformen nachgewiesen werden. Vier separate α -Actinin-codierende Gene erzeugen sechs verschiedene gewebespezifisch exprimierte α -Actinin-Isoformen (Beggs et al., 1992, Honda et al., 1998, Southby et al., 1999, Mills et al., 2001). Durch "Yeast Two-Hybrid"-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von α -Actinin mit Raver1 über die C-Termini beider Proteine erfolgt. In immunhistochemischen Untersuchungen am Skelettmuskel der Maus kolokalisieren Raver1 und α -Actinin im Bereich der Z-Linie (Hüttelmaier et al., 2001).

Aktin ist ein hoch konserviertes Protein. Es stellt die Hauptstrukturkomponente des cytoplasmatischen Mikrofilamentsystems dar und ist für vielfältige Adhäsions- und Bewegungsvorgänge essenziell (Pollard und Borisy, 2003). Außerdem konnte Aktin als Komponente des Zellkerns identifiziert werden (Jockusch et al., 1971, Clark und Merriam, 1977, Pederson und Aebi, 2002). Kürzlich konnte eine funktionelle Assoziation von Aktin mit allen drei RNA-Polymerasen nachgewiesen werden (Philimonenko et al., 2004, Hu et al., 2004, Kukalev et al., 2005). Durch die Assoziation von Kernaktin mit snRNPs (Sahlas et al., 1993) und hnRNPs (Percipalle et al., 2002) könnte Aktin ebenso an der RNA-Prozessierung und dem RNA-Transport beteiligt sein. Eine Beteiligung am Export einiger viraler RNAs wurde ebenfalls gezeigt (Hoffmann et al., 2001). Bis heute ist die genaue Natur der Raver1-Aktin-Interaktion nicht geklärt. In Gelfiltrationsanalysen konnten Aktin, PTB und Raver1 in gemeinsamen

Komplexen aus angereicherten Kernextrakten nachgewiesen werden. Eine Kolo­kalisierung von Raver1 und Aktin konnte aber auch in der I-Z-I-Region von Myofibrillen gezeigt werden (Dissertation A. Zieseniß, 2005).

1.4.3 Funktion von Raver1 als Korepressor des alternativen Spleißens

Aufgrund der Tatsache, dass Raver1 durch seine RRM­s der hnRNP-Familie zugeordnet wird und mit PTB interagiert, ist eine Beteiligung von Raver1 an der RNA-Prozessierung denkbar. Erste Hinweise auf eine entsprechende Funktion ergaben sich aus *in vitro* Befunden, wonach Raver1 das PTB-vermittelten Spleißen des α -Tropomyosin­es modulieren kann (Gromak et al., 2003). Zur Untersuchung des alternativen Spleißens werden überwiegend *in vitro* Analysen an „Minigenen“ durchgeführt, die einen kleinen Bereich der prä-mRNA des zu untersuchenden Gens darstellen. Hier stellt das glattmuskelspezifische Spleißen des α -Tropomyosin­es (siehe Kapitel 1.3) ein gut charakterisiertes Modellsystem dar, wobei in einer von Glattmuskelzellen abgeleiteten Zelllinie (Pac-1), mithilfe des „Minigens“ das PTB-abhängige Spleißen von Nichtmuskel- zu Glattmuskel- α -Tropomyosin verfolgt wird (Spellman et al., 2005). In diesem Modellsystem wurde festgestellt, dass Raver1 die PTB-abhängige Repression von Exon 3 des α -Tropomyosin­es verstärkt und dadurch die Erzeugung der glattmuskelspezifischen Tropomyosin-Isoform begünstigt, die das alternative Exon 2 enthält (Gromak et al., 2003). Die Autoren postulieren, dass Raver1 als Korepressor von PTB fungiert, und dazu über Interaktion mit PTB ebenfalls an prä-mRNA rekrutiert wird (Gromak et al., 2003). Generell ist die Beeinflussung alternativer Spleißvorgänge durch Raver1 eine attraktive Hypothese. Eine direkte Bindung von Raver1 an prä-mRNA/RNA konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden. Auch scheint die Funktion von Raver1 als Korepressor nicht an die Präsenz der RRM­s gebunden zu sein (Gromak et al., 2003).

Über die genaue zelluläre Funktion von Raver1 kann bisher nur spekuliert werden. Allerdings legen die bisherigen Beobachtungen die Vermutung nahe, dass Raver1 als Mediator zwischen Zellkern und Aktin-assoziierten Adhärenzverbindungen fungiert. Es ist daher vorstellbar, dass Raver1 im Zellkern über seine eigenen RRM­s oder im Komplex mit anderen hnRNP­s RNA bindet und an deren Prozessierung beteiligt ist. Aufgrund der Fähigkeit von Raver1 zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln, wäre ebenfalls eine Beteiligung von Raver1 am mRNA-Transport vorstellbar, und durch den gezielten Transport der mRNA könnte Raver1 zur lokalen Proteinbiosynthese beitragen und damit Einfluss auf die molekulare Architektur muskulärer Adhärenzverbindungen nehmen (Jockusch et al., 2003).

1.4.4 Die Inaktivierung des Raver1-Gens in der Maus

Um weitere Hinweise auf die Funktion von Raver1 im Organismus zu bekommen, wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. H. Arnold Raver1-defiziente Mäuse hergestellt (Studienarbeit T. Worbs, 2001, Diplomarbeit M. Wendland, 2002). Das Raver1-Gen der Maus umfasst 17 Exone, die sich über 25 kb DNA erstrecken. Das Raver1-Protein wird durch die Exone 1-13 codiert. Im Rekombinationsvektor für die Generierung einer konventionellen Verlustmutante des Raver1-Gens wurden die Exone 1-3 deletiert und das bakterielle β -Galaktosidasegen sowie eine durch den Phosphoglycerat-Promotor (PGK-Promotor) getriebene Neomycin-Kassette in reverser Transkriptionsrichtung inseriert (siehe Abbildung 1.06). Die Neomycin-Kassette ist von Erkennungssequenzen der Flip und Cre-Rekombinase flankiert, die eine spätere Entfernung der Neomycin-Kassette ermöglichen sollte.

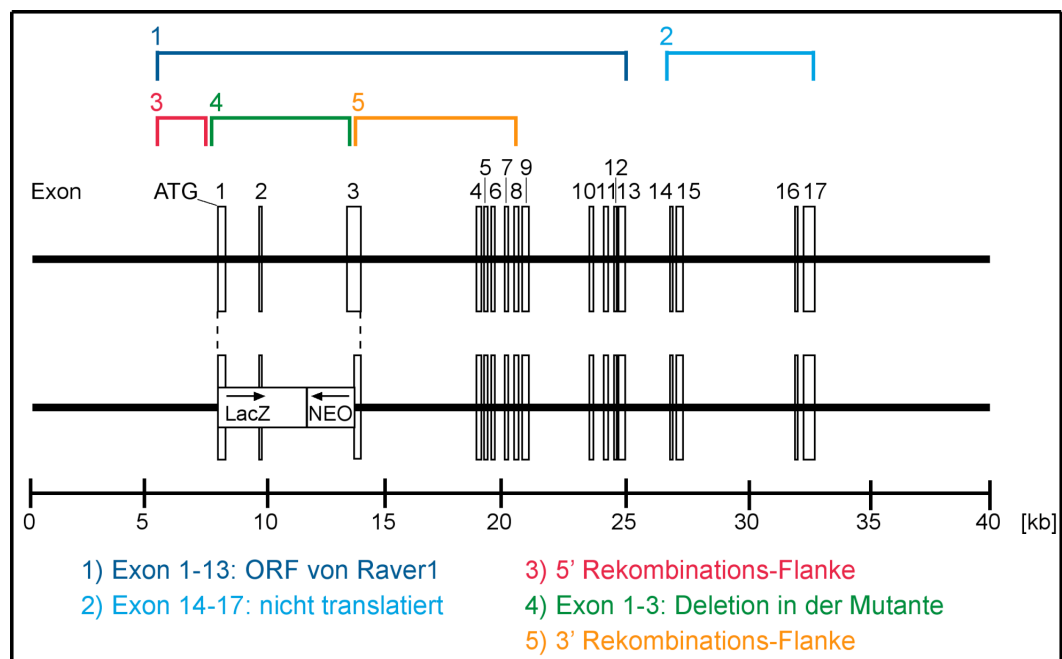


Abbildung 1.06: Schema zur Inaktivierung des Raver1-Gens in der Maus. Darstellung der genomischen Organisation des murinen Raver1-Locus und der Insertion durch homologe Rekombination des Deletionskonstruktes. Die 17 Exone (Boxen) verteilen sich über einen Bereich von fast 25 kb. Das Startcodon (ATG) befindet sich in Exon 1, das offene Leseraster (ORF) umfasst Exon 1-13. Die drei RRM von Raver1 verteilen sich auf die Exone 1-4 und werden im Deletionskonstrukt größtenteils durch das bakterielle β -Galaktosidasegen (LacZ) sowie der in reverser Orientierung angeordneten Neomycin-Kassette (NEO) ersetzt (Studienarbeit T. Worbs, 2001).

Anhand erster Analysen der Raver1-Mausmutanten konnte festgestellt werden, dass der PGK-Promotor als Bestandteil der revers orientierten Neomycin-Kassette offensichtlich bidirektional

aktiv war, was zur Expression eines hypomorphen Raver1-Proteins führte. Eine unerwartete PGK-Promotoraktivität wurde kürzlich auch für eine Mutation im Men1-Gen beschrieben (Scacheri et al., 2001). Für Raver1 konnte über eine gezielte Deletion der Neomycin-Kassette einschließlich des PGK-Promotors mit Hilfe der flankierenden Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase und durch Verpaarung mit Zp3-Cre Mäusen (Lewandoski et al., 1997), eine Nullmutante erzeugt werden (M. Fabienke, unveröffentlicht).

Die auf diese Weise generierten Raver1-defizienten Mäuse sind lebensfähig und fertil. Sie weisen unter einer normalen Käfighaltung keine auffälligen phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf (M. Fabienke und H. H. Arnold, unveröffentlicht).

1.5 Ziel der Arbeit

Die zur Aufklärung der *in vivo* Funktion von Raver1 hergestellten Raver1-defizienten Mäuse lagen als Ausgangsmaterial der hier vorliegenden Arbeit zugrunde. Aus dem Fehlen eines auffallend veränderten Phänotyps bei den Raver1-defizienten Mäusen kann geschlossen werden, dass Raver1 kein für die Embryonalentwicklung essenzielles Genprodukt darstellt oder der Organismus zumindest die Fähigkeit besitzt, diesen Protein-Verlust zu kompensieren. Da diese Fähigkeit möglicherweise nicht auf zellulärer Ebene ausgeprägt ist, sollte zunächst der Verlust von Raver1 anhand von Zellkulturen untersucht werden. Hierzu sollten Zelllinien der unterschiedlichen Genotypen aus primären Fibroblasten generiert werden und mittels zellbiologischer Methoden vergleichend analysiert werden.

Erste Hinweise deuteten darauf hin, dass weitere Raver1-homologe Proteine existieren. Von daher sollte in einem weiteren Ansatz, in Datenbank-Recherchen nach Raver1-homologen Proteinen gesucht werden. Bei einer erfolgreichen Datenbank-Analyse sollte das neuentdeckte Raver1-ähnliche Protein vergleichend zu Raver1 analysiert werden.

Die *in vitro* beschriebene Funktion von Raver1, das alternative Spleißen des α -Tropomyosins zu modulieren, konnte für Raver1-defiziente Mäuse nicht bestätigt werden. Auch die Zuordnung von Raver1 zu der hnRNP-Familie erfolgte zunächst nur über die RRM, nicht über RNA-Bindung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher auch eine detaillierte Analyse einer möglichen RNA-Bindung von Raver1 und gegebenenfalls weiterer homologer Proteine durchgeführt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

CCD-Kamera:	VarioCam Intas, PCO Computer Optics GmbH, Kelheim
Blotter:	Semy-Dry-Blot, Fröbel, Lindau
ELISA-Reader:	MRX, Dynatech Lab., Denkendorf
Geldokumentationsanlage:	Herolab GmbH, Wiesbaden
Heizblock:	DRI-Block DB-2A, Techne, Staffordshire, UK
Heizrührer:	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
Inkubatoren:	Jouan EB280, Fernwald Steri-Cult200, Forma Scientific, Ohio, USA
Mikroskope:	Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Zeiss, Göttingen Invertmikroskop Telafal 31 , Zeiss, Göttingen
Photometer:	UV 1202, Shimadzu, Duisburg
Schüttelinkubator:	Certomat, Sartorius BBI Systems, Melsungen Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Sequenzierer:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Weiterstedt
Software:	MetaMorph®, Adobe Photoshop 7.0, Microsoft Office Mac OS X, Lasergene DNASTar
Szintillationszähler:	Beckmann MC2 Szintillationszähler, München
Thermocycler:	Thermocycler MJ Research, MWG, Ebersberg
Ultraschallgerät:	Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker TM2400, Stratagene, Heidelberg
UV-Leuchttisch:	E.A.S.Y. RH, Herolab GmbH, Wiesbaden
Vortex Genie TM 2:	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge J2-MC, Beckman, München Kühlzentrifuge 3K15, Sigma, Osterode am Harz Tischzentrifuge 113, Sigma, Osterode am Harz Ultrazentrifuge TL100, Beckmann, München

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), AppliChem (Darmstadt), Difco (Hamburg), ICN (Eschwege) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Bezugsquelle für Enzyme waren, sofern nicht anders vermerkt, die Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main), Promega (Mannheim), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Appligene (Heidelberg) und Fermentas (St.Leon-Rot). Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser (H₂O) angesetzt, welches mit einem Milli-Q/UF-System (Millipore, Eschborn) aufbereitet wurde. Sterilisiert wurde durch Autoklavieren bzw. Sterilfiltrieren.

2.1.3 Bakterien

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden die *E. coli*-Stämme XL1-blue, ER2566, BL21 (DE3) und M15(pREP4) eingesetzt.

Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

XL1-blue: supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q LacZΔM15 tn10(tet^r)] (Bullock et al., 1987)

ER2566: F⁻ lamda⁻ fhuA2 [lon]ompT LacZ::T7 gene 1 gal Sul A11 D(mcrC-mrr) 114::IS10 R(mcr-73::mini Tn10 - - Tet S) 2R (Zgb-210::Tn10) (Tet S) end A1 [dcm] (New England Biolabs)

BL21 (DE3): F⁻, ompT, r_B⁻m_B⁻hsdS gal (λcIts857, ind1, Sam7, nin5, lac UV5-T7 gene 1) (Studier und Moffatt, 1986)

M15(pREP4): Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺, (Villarejo und Zabin, 1974)

Zur Anzucht von *E. coli* wurde 2xYT-Vollmedium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) oder LB-Medium (Luria Bertani; 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) verwendet. Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des verwendeten Vektors mit 30 µg Kanamycin/ml oder 150 µg Ampicillin/ml supplementiert. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium 1,5% (w/v) *Agar-Agar* zugegeben.

2.1.4 Hefen

Die Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien mittels des „Yeast Two-Hybrid“ Systems („Matchmaker Two-Hybrid System“, Clontech, Heidelberg) wurden mit dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm HF7c mit folgendem Genotyp durchgeführt.

HF7c: MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, URA3::(GAL4 17-mers)₃-CYC1-lacZ (Feilotter et al., 1994)

Als Standardmedium für die Anzucht von Hefezellen wurde YPD-Medium (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2% Glucose) eingesetzt. Für YPD-Agarplatten wurde das YPD-Medium mit 2% (w/v) *Agar-Agar* versetzt.

Die Zusammensetzung aller weiteren Medien für das „Yeast Two-Hybrid“ System wurden dem Herstellerprotokoll („Matchmaker Two-Hybrid System“, Clontech) entnommen.

2.1.5 Tierische Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Zelllinien verwendet:

HeLa X1/5	ATCC CCL-2; epithelartige <i>Adenocarcinoma</i> -Zellen, Gebärmutter, Mensch, (Gossen und Bujard, 1992)
C2C12	ATCC CRL-1772; Myoblasten-Zellen der Maus (Yaffe und Saxel, 1977, Blau et al., 1985)
PC-19	ATCC CR2-1721; <i>Phaeochromocytoma</i> -Zellen, Tumorzellen aus dem Nebennierenmark, Ratte (Greene und Tischler, 1976, Levi et al., 1985)
NEURO-2a	ATCC CCL-131; Neuroblastoma-Zellen, Maus (Klebe et al., 1970)
NSC-19	„Neuroblastoma Spinal Cord“-Zellen, Maus (Cashman et al., 1992)

Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Zellkulturgefäßen der Firma Nunc (Wiesbaden) bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. HeLa X1/5, C2C12 und NSC-19 Zellen wurden in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM, PAA Laboratories), supplementiert mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS), kultiviert. PC-12 Zellen wurden in DMEM mit 10% „Horse“ Serum (HS) und 5% FCS kultiviert. NEURO-2a (N2a) wurden in MEM Medium (PAA Laboratories) gehalten, das mit 10% FCS supplementiert war.

2.1.6 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Klonierung von PCR-Produkten der Vektor pCR[®]-blunt (Invitrogen) eingesetzt. Für die transiente Expression von Proteinen in tierischen Zellen wurden die Vektoren pcDNA3 (Invitrogen) und pEGFP-C2 (Clontech) verwendet. „Yeast Two-Hybrid“ Analysen wurden mittels der Vektoren pGADT7 und pGBKT7 (Clontech) durchgeführt. Die Expression von Proteinen in Prokaryonten erfolgte mit dem Vektor pQE30 (Qiagen, Hilden).

2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Die für die Klonierung verwendeten Oligodesoxynukleotiden der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte sind in Tabelle 2.01 aufgelistet.

Tabelle 2.01: Klonierungs-Oligodesoxynukleotiden

Name	Oligodesoxynukleotid-Sequenz	Konstrukt
RaverII-SecoRI	5'-GAA TTC ATG TGG GTA GAG GTT CAT GAG-3'	Raver2 gesamt Start ATG
MR2XhoIreverseII	5'-G CTC GAG TTA GTA CAC ACG CTT CTT-3'	Raver2 gesamt Stopcodon
R2RRM1sEcoRI	5'-G GAA TTC ATG CTG CAG CCC ACA G-3'	Raver2 ΔRRM1
R2RRM12sEcoRI	5'-G GAA TTC ATG GAT GTT AAT CTC TT-3'	Raver2 ΔRRM12
R2RRM123sEcoRI	5'-G GAA TTC ATG TCC TCC TGC GCC-3'	Raver2 ΔRRM123
mPTB1EcoRIs	5'-G GAA TTC ATG AGC AGC TCT GCC T-3'	PTB1 gesamt Start ATG
mPTB1XhoIr	5'-G CTC GAG TTA GAT GGT GGA CTT G-3'	PTB1 gesamt Stopcodon
PTB1RRM34EcoRIs	5'-G GAA TTC ATG CTT TTG GTC AGC-3'	PTB1-RRM34
PTB1_RRM12Xhor	5'-G CTC GAG TTA GAC AGA ATT GCC-3'	PTB1-RRM12

Die zur Sequenzierung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten cDNA-Konstrukte verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.02 aufgelistet.

Tabelle 2.02: Sequenzierungs-Oligodesoxynukleotide

Name	Oligodesoxynukleotid-Sequenz	Sequenzierung
Raver2-Seq1-s	5'-GGC AAC ATC GAG AGA TGT TTT TTG G-3'	Raver2
Raver2-Seq2-s	5'-GCC AGC TTG CAC AGG ATG AAG GAA-3'	Raver2
Raver2-Seq3-s	5'-AGC GAA GCT AGC TTC TCA GGG TCG-3'	Raver2
Raver2-Seq1-r	5'-GGG CGC AGA AGG ACA GTT GAA CT-3'	Raver2
Raver2-Seq2-r	5'-GCG GTG TCT TCT GGT TGC CCG T-3'	Raver2
Raver2-Seq3-r	5'-CAG TGG ATA GGC ACA CAC TGG GT-3'	PTB1
PTB1sense1	5'-GAG ATG AAC ACG GAG GAG GCT-3'	PTB1
PTB1reverse1	5'-GTC GGT CTT CAG CTC CTT GTG-3'	PTB1
PTB1sense2	5'-GAA CAA CCA GTT CCA GGC CCT-3'	PTB1
PTB1reverse2	5'-GTT GTA CTT GAC GTT GAG GCT G-3'	PTB1
PTB1sense3	5'-CCT TTC CGT TCC GAA CGT CCA-3'	PTB1
PTB1reverse3	5'-GCA CGT CAC CGT AGA CGC CGA-3'	PTB1
PTB1sense4	5'-GGA GGA TCT CAA GGT CCT GTT T-3'	PTB1
PTB1reverse4	5'-GGA TCA GTG CCA TCT TGC GGT-3'	PTB1
pGAD-Seq/sense	5'-GGA TGT TTA ATA CCA CTA CAA TGG ATG-3'	„Yeast Two-Hybrid“ Vektor
pGAD-Seq/reverse	5'-GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC GGG G-3'	„Yeast Two-Hybrid“ Vektor
T7-Promotor-Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3'	Vektor pCR-blunt
M13 Reverse Primer	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	Vektor pCR-blunt

Die für die Konstruktion von Vektoren mit einem N-terminalen „tag“ verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 2.03 dargestellt.

Die Konstruktion von Expressionsvektoren mit N-terminalem FLAG-„tag“, die die Detektion entsprechender Fusionsproteine durch den monoklonalen FLAG-Antikörper M2 (Sigma) ermöglichen, erfolgte unter Berücksichtigung des Leserasters. Die Konstruktion des BiPro-„tags“, einer Sequenzabfolge aus Birkenprofilin, erfolgte ebenfalls unter Berücksichtigung des Leserasters. Der BiPro-„tag“ kodiert für die Aminosäuresequenz NSFPQFKPQEI, die das Epitop des monoklonalen BiPro-Antikörpers 4A6 repräsentiert (Rüdiger et al., 1997).

Tabelle 2.03: Oligodesoxynukleotide für Sequenzmarker

Name	Oligodesoxynukleotid-Sequenz	Konstrukt
BamHI-N-Flag	5'-GAT CCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ACA AGG-3'	FLAG-„tag“
EcoRI-N-Flag	5'-AAT TCG ATT TCC TGA GGC TTA AAC TGT GGG AAG GAC ATG-3'	FLAG-„tag“
BamHI-NBiPro	5'-GAT CCA TGT CCT TCC CAC AGT TTA AGC CTC AGG AAA TCG-3'	BiPro-„tag“
EcoRI-NBiPro	5'-AAT TCG ATT TCC TGA GGC TTA AAC TGT GGG AAG GAC ATG-3'	BiPro-„tag“

2.1.8 cDNA-Banken

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Maus-17,5 d-embryonal cDNA-Bank (Mouse 17,5-day Embryo MATCHMAKER cDNA Library) der Firma Clontech eingesetzt. Diese Bank liegt im „Yeast Two-Hybrid“-Vektor pGAD10 vor der die Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors enthält. Die in Hefen exprimierten Proteine stellen somit Chimäre des GAL4-Transkriptionsfaktors (N-terminal) und des einklonierten Genproduktes (cDNA) dar.

2.1.9 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen für verschiedene Anwendungen sind in den Tabellen 2.04 und 2.05 aufgeführt.

Tabelle 2.04: Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Art	Verdünnung
FLAG (M2)	FLAG-Epitop-„tag“	Sigma	Maus	monoklonal	1:5000 WB, 1:1000 IF, 1:5000 ELISA
BiPro (4A6)	BiPro-Epitop-„tag“	EH	Maus	monoklonal	1:50 WB, 1:10 IF, 1:100 ELISA
4C8	Raver2	EH	Maus	monoklonal	1:2 WB, 1:5 IF
5G6	Raver1	EH	Maus	monoklonal	1:2 WB, 1:10 IF
7D3	Raver1	EH	Maus	monoklonal	1:5 WB, 1:10 IF
BB7	PTB	C. W. Smith, Cambridge, UK *	Maus	monoklonal	1:2 WB, 1:10 IF
PTB	PTB	C. W. Smith, Cambridge, UK *	Kaninchen	polyklonal	1:1000 WB
2G2	Aktin	EH	Maus	monoklonal	1:5 WB, 1:2 IF
Aktin	Aktin	Sigma	Kaninchen	polyklonal	1:200 WB
DM1A	Tubulin	Sigma	Maus	monoklonal	1:5000 WB, 1:500 IF
hVin1	Vinculin-Kopf	Sigma	Maus	monoklonal	1:2000 WB, 1:200 IF
α -Actinin	α -Actinin	Sigma	Maus	monoklonal	1:5000 WB, 1:1000 IF
α -Actinin	α -Actinin	Sigma	Kaninchen	polyklonal	1:500 WB, 1:50 IF
6E3	Metavinculin-Einschub-Peptid	EH	Maus	monoklonal	1:10 WB
Tropomyosin	Tropomyosin	Sigma	Maus	monoklonal	1:1000 WB, 1:500 IF
LaminB	LaminB	Progen	Maus	monoklonal	1:10 IF
Map2	„Microtubule associated Protein2“	Covance	Kaninchen	polyklonal	1:1000 IF
GFAP	„Glial Fibrillary Acid Protein“	Dako Cytomation	Kaninchen	polyklonal	1:2000 IF

EH: Eigene Herstellung (Sabine Buchmeier, AG Jockusch), WB: „Western Blot“, IF: Immunfluoreszenz. * Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. W. Smith

Tabelle 2.05: Zusammenfassung aller verwendeten Zweitantikörper und anderer verwendeter Agenzien

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Verdünnung
anti-Maus-IgG-HRP	Maus IgG	Sigma	Kaninchen	1:5000 WB/ELISA
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Kaninchen IgG	Sigma	Ziege	1:5000 WB/ELISA
anti-Maus-IgG-FITC	Maus IgG	Sigma	Ziege	1:50 IF
anti-Maus-IgG-TRITC	Maus IgG	Sigma	Ziege	1:100 IF
anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 549	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:300 IF
anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:250 IF
Cy TM 3 –conjugated AffiniPure Ziege anti-Maus-IgG	Maus IgG	Jackson Immuno Research	Ziege	1:200 IF
Phalloidin-FITC	-	Sigma	-	1:50 IF
Phalloidin-TRITC	-	Sigma	-	1:100 IF
DAPI		Appllichem		1.1000

WB: „Western Blot“, IF:Immunfluoreszenz

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die als kompetente Zellen bezeichneten Bakterien nehmen nach einer Vorbehandlung leicht in Lösung befindliche DNA auf.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml 2YT-Medium mit einer über Nacht (üN)-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,5-0,8$) bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min auf Eis inkubiert und bei 4°C und 6000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in einem Kulturvolumen eiskaltem TFB I (0,3 M Natriumacetat pH 5,8, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glycerin) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und wie oben, zentrifugiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 1,3 ml TFB II (100 mM MOPS pH 7,0, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM NaCl, 15% Glycerin) pro 10 ml Kultur aufgenommen und als 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s, der die Aufnahme von Plasmid-DNA fördert. Nach Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für 2 min wurde zur Regeneration der Zellen 500 µl antibiotikafreies Medium hinzugegeben und für 30 min bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde bei 6000 rpm für 3 min zentrifugiert, das Bakteriensediment in 200 µl Medium resuspendiert und auf Antibiotika-haltigen 2xYT-Agarplatten ausgespatelt und üN bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Plasmid-Minipräparation

Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab aus transformierten *E. coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse aufgereinigt (Birnboim und Doly, 1979). Hierzu wurden 1,5 ml *E. coli*-üN-Kultur bei 6000 rpm für 5 min sedimentiert und das Bakteriensediment in 300 µl P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) und Mischen der Suspension durch Invertieren erfolgte die Lyse der Bakterien. Nach Neutralisation durch 300 µl P3 (3 M K-Acetat, pH 5,5) erfolgte eine Präzipitation denaturierter Proteine und genomischer DNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde erneut für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und für 30 min bei 13000 rpm präzipitiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

2.2.4 Plasmid-Midi-Präparation

Um große DNA-Mengen hoher Reinheit für Transfektionsexperimente zu erhalten, wurde eine alkalische Lyse mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Qiagen).

2.2.5 Hefe-DNA-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde nach der Sphäroblasten-Methode durchgeführt. 4 ml einer Hefe üN-Kultur in YPD-Medium wurden für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Hefesediment wurde in 600 µl Sorbitol-Lösung (0,9 M Sorbitol, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA), welcher β-Mercaptoethanol und Lyticase (10 ml Sorbitol-Lösung, 4 mg Lyticase; 20 µl β-Mercaptoethanol) zum Verdau der Hefezellwand zugesetzt wurden, resuspendiert, für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Sphäroblasten wurden in 250 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert, mit 50 µl 10% SDS versetzt, invertiert und für 20 min bei 65°C inkubiert. Proteine wurden durch die Zugabe von 100 µl 5 M Kalium-Acetat ausgefällt. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis wurden die Proteine und Zelltrümmer zweimal für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 700 µl 100% Ethanol versetzt und die DNA durch eine Inkubation für 10 min bei RT und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm präzipitiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert. Für die Transformation in *E. coli* wurden 5 µl DNA eingesetzt.

2.2.6 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen). Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA und RNA 40 µg/ml. Der Verunreinigungsgrad der DNA-Lösung durch Proteine oder Phenole wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäurereste und Phenole) ermittelt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch Proteinverunreinigungen wird der Quotient zu kleineren Werten verschoben.

2.2.7 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Mittels Mg^{2+} -abhängigen Restriktionsendonukleasen des Typs II können DNA-Fragmente an spezifischen palindromischen Sequenzen gespaltet werden. Dabei werden Phosphodiesterbrücken der Nukleinsäure hydrolysiert, wobei in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder „sticky ends“ (5'- oder 3'-Überhänge) oder „blunt ends“ (glatte Enden) entstehen.

Für die Reaktion wurden die vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer verwendet. Bei einer analytischen Restriktionsspaltung wurden 0,5-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA für präparative Anwendungen 2-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA in einem Reaktionsvolumen vom 10-50 μl mit 0,5-1 U Enzym/ μg DNA (1 Unit \approx Spaltung von 1 μg DNA/h) eingesetzt.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden gemäß ihrer Größe in einer Agarosematrix im elektrischen Feld aufgetrennt. Je nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5% Agarosegele in 1xTBE (89 mM Tris/HCL pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden mittels des interkalierenden und fluoreszierenden Ethidiumbromid (7 μl auf 100 ml Agarose-Lösung: 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung), das dem Gel direkt zugesetzt wurde, unter UV-Licht nachgewiesen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100-120 V.

Als Längenstandard und zur Bestimmung der aufgetrennten DNA-Mengen wurde *EcoR* I/*Hind* III verdaute λ -DNA eingesetzt.

2.2.9 DNA-Fragmentisolierung aus Agarose

Die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen erfolgte durch die Bindung der negativ geladenen DNA an Glasmilch (QIAEX[®]II Suspension) und anschließender Elution. Dazu wurde der QIAEX[®]II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.10 Ligation

Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen zwei DNA-Fragmenten katalysiert. Als Kofaktor zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe benötigt die verwendete virale T4 DNA-Ligase ATP in den entsprechenden Puffern.

Die Ligation wurde in 10 µl Ansätzen durchgeführt (1 µl 10xAppligene-Ligase Puffer, 1 U T4 DNA-Ligase, „Insert“ und 0,1-0,5 µg Vektor in einem Verhältnis von ca. 10-5:1) und 1 h bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Behandlung für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.2.11 Hybridisierung von Oligodesoxynukleotiden zur Herstellung von Sequenzmarkern („tags“)

Für die Herstellung der Sequenzmarker aus Oligodesoxynukleotiden wurden die entsprechenden komplementären Oligodesoxynukleotide miteinander hybridisiert. Je 5 µl „sense“ und „reverse“ Oligodesoxynukleotid mit einer Konzentration von je 100 pmol/µl wurden mit 90 µl H₂O gemischt, 2 min bei 95°C inkubiert und zur Hybridisierung langsam auf 4°C abgekühlt. In der Regel wurden die Oligodesoxynukleotide so synthetisiert, dass die Hybride an den Enden überstehende Einzelstrangsequenzen tragen, die in ihrer Sequenz den Überhängen entsprechen, die nach Restriktion mit spezifischen für die Klonierung verwendeten-Endonukleasen entstanden wären. Die so hergestellten „Linker“ wurden direkt in der Ligation eingesetzt.

Dieses Verfahren wurde für die simultane Klonierung kurzer 5'-gelegener „tags“ mit den gewünschten cDNA-Fragmenten in Expressionsvektoren verwendet und dient dazu, die Detektion der zu untersuchenden Proteine zu erleichtern. Die verwendeten „tags“ waren zum einen der so genannte BiPro-„tag“, der aus einer kurzen Aminosäuresequenz des Proteins Profilin aus der Birke besteht. Dieser kann durch einen entsprechenden monoklonalen Antikörper (4A6; Wiedemann et al., 1996, Rüdiger et al., 1997) spezifisch nachgewiesen werden. Andererseits kam der so genannte FLAG-Epitop-„tag“ zum Einsatz, gegen den Antikörper käuflich zu erwerben sind (Sigma).

2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird eine exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch zyklische Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung („Annealing“) und DNA-Synthese erreicht. Durch das exponentielle Ansteigen des Amplifikates erhält man selbst aus geringen Mengen Ausgangsmaterial eine für weitere Klonierungen ausreichende Menge der gewünschten DNA-Sequenz. Durch Einführung von Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsenzyme bietet diese Methode die Möglichkeit, spezifische cDNA-Bereiche zu amplifizieren und in definierter Orientierung zu klonieren. Für rein analytische Zwecke wurde die Taq-DNA-Polymerase (Takara, Appligene) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt, die über keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt und entsprechend eine erhöhte Fehlerrate während der Synthese aufweist. Wurde auf eine geringere Fehlerrate für weitere Klonierungen Wert gelegt, erfolgte die Amplifikation mit der Tli-DNA-Polymerase (Promega), die über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Die Qualität der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die entsprechende Bande quantitativ durch eine Fragment-Isolierung präpariert.

PCR-Ansätze zur präparativen Amplifikation von DNA wurden nach dem folgenden Protokoll zusammengestellt: 5 µl 10xTli-Puffer, 5 µl 10xMgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTPs (2,5 mM), 1,5 µl je Primer (10 pmol/µl), 25–50 ng „template“-DNA, 0,5 µl Tli-Polymerase (5 U/µl). Der Ansatz wurde auf 50 µl mit H₂O aufgefüllt.

2.2.13 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Zwischenklonierung wurden PCR-Fragmente in den pCR®-blunt Vektor (Invitrogen) kloniert, da dieses System eine hohe Effizienz für rekombinante Klone garantiert. Die Ligation wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und der Ligationsansatz direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

2.2.14 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung

Die nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA basiert auf einem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977). Die hier eingesetzte Methode bedient sich

der AmpliTaq®-Polymerase FS (PE AppliedBiosystems, Weiterstadt) und wird als „Cycle-Sequencing“ bezeichnet.

Hierbei werden zusätzlich zu den Desoxynukleotiden Didesoxynukleotide eingesetzt, die aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe keine weiteren Phosphodiesterbindungen ausbilden können und somit zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide können die DNA-Moleküle mit Hilfe des ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (PE AppliedBiosystems) mittels Laser detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgt automatisch über die zugehörige Software.

Für die PCR-Sequenzreaktion wurden 2 µl Premix, 1 µl Primer (5 pmol/µl) und 0,25-0,5 µg dsDNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide zu entfernen, wurde der PCR Ansatz mit 2 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 55 µl 100 % reinem Ethanol versetzt und anschließend 30 min bei 13000 rpm präzipitiert. Das Sediment wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Der getrocknete Ansatz wurde in 13 µl TSR („Template Supression Reagent“, PE AppliedBiosystems) aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer nach Herstellerangaben.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden cDNAs in den bakteriellen Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) kloniert. Dieser Vektor ermöglicht es, das gewünschte Polypeptid mit einem N-terminalen Fusionsanteil von 6 Histidinen in *E. coli* zu exprimieren.

Der His-„tag“ bindet mit hoher Affinität an Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA)-Agarose, wodurch sich eine einfache Aufreinigungsmethode ergibt. Zudem sind die Fusionsproteine mit einem FLAG-„tag“ oder BiPro-„tag“ versehen, welcher jeweils zwischen His-„tag“ und cDNA positioniert wurde und eine einfache Detektion der exprimierten Proteine mittels entsprechender Antikörper im „Western Blot“ ermöglichen.

Die Expression in *E. coli* erfolgte in den Stämmen ER2566, BL21 und M15. Die Stämme tragen das pRep4-Plasmid, welches für den Lac-Repressor kodiert und zudem eine Kanamycinresistenz aufweist. Über dieses Plasmid lässt sich die Expression mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) kontrollieren, da es an den Lac-Repressor bindet und ihn so inaktiviert.

2.3.1.1 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Zur quantitativen Aufreinigung von Proteinen wurden die pQE30-Konstrukte in die *E.coli*-Stämme BL21, ER2566 oder M15 transformiert. Es wurden 1-2 l Hauptkulturen (2xYT-Medium mit Kana/Amp, 50 μ g/ml L-Prolin, 5 μ g/ml Thiamin, 5 μ g/ml Arginin, 10 μ g/ml Leucin) angeimpft, die bei 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm) inkubiert wurden. Bei $OD_{600} = 0,5-0,8$ erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG die Induktion und einer weiteren Inkubation bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase. Die Bakterien wurden im Anschluss durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt (6500 rpm) bei 4°C sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 20-40 ml Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 0,5% Tween 20) mit 1 mg/ml Lysozym sowie Proteaseinhibitoren [AEBSF: 0,2 M in H_2O (1:500), PepstatinA: 1 mM in Ethanol (1:500), Leupeptin: 10 mM in H_2O (1:500), Trasylol: 2,8 mg/ml in H_2O (1:500)] und β -Mercaptoethanol (1:1000) resuspendiert und bei -70°C nach Zugabe von immobilisiertem EDTA (Chelate-P, Serva) eingefroren.

2.3.1.2 Zellaufschluss und Proteinaufreinigung His-"tag"markierter Proteine über Ni-NTA-Agarose-„Beads“

Die mit einem His-„tag“ versehenen rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine binden hierbei über ihren N-terminalen Fusionsanteil, bestehend aus sechs Histidinen, an Ni-NTA, welche wiederum an eine Matrix aus Agarose gebunden ist.

Um die rekombinanten Proteine unter nativen Bedingungen aufzureinigen, wurde das Zelllysate zunächst bei 37°C aufgetaut und sofort mit frischen Proteaseinhibitoren versetzt. Alle folgenden Schritte fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Die Zellen wurden per Ultraschall aufgeschlossen (4 x 30 s Intervalle bei 80 W) und anschließend 30 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt befanden sich die löslichen Proteine im Überstand, der auf die zuvor durch zweimaliges Waschen mit Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 25 mM

Imidazol, 0,5% Tween 20; frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol) äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Schwenken, welches die Bindung der Proteine an die Matrix erhöhen sollte. Um die Reinheit der Proteinproben zu erhöhen, wurde zweimal mit Lysispuffer, zweimal mit Waschpuffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 6,0, 300 mM NaCl, 0,5% Tween 20, 8,7% Glycerin, frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol) und zweimal mit Elutionspuffer (50 mM $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ pH 6,7, 100 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 25 mM EDTA, 0,1% Triton-X-100, frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol) ohne Histidin gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 150 mM Histidin zum Elutionspuffer. Nach jeweils einer kurzen Inkubationszeit (5-10 min) wurden 3 Elutionsfraktionen von je 2,5 ml gesammelt. Diese wurden mit einer „Ponceau“-Rotfärbung auf einer Nitrocellulose-Membran voruntersucht und die proteinhaltigen Fraktionen mittels PD10-Säule umgepuffert. Um die Aufreinigung der Proteine zu verfolgen, wurden Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte genommen und im SDS-Gel analysiert.

2.3.1.3 Umpuffern von Proteinen über Gelfiltration: PD10-Säulen

Über eine PD10-Säule (Pharmacia, Freiburg) lassen sich Volumina von bis zu 2,5 ml umpuffern. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 ml PTB-Puffers (20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 5% Glycerin; frisch 0,5 mM DTT und Proteaseinhibitoren 1:500) äquilibriert. Im Anschluss konnte ein Gesamtvolumen von 2,5 ml Probe aufgetragen werden. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml PTB-Puffer. Rekombinantes PTB1 und Raver2-Protein wurden in PTB-Puffer umgepuffert.

2.3.1.4 Ankonzentrieren von Proteinen

Um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu erhöhen, wurde die Methode der Zentrifugation der Proteinlösung in Röhrchen mit integriertem Filter (Millipore) angewendet. Die für die Ankonzentrierung von Raver2 und PTB1 verwendete Ausschlussgrenze der Filter betrug 10 kDa. Bei einer Zentrifugation mit 4500 rpm kommt es zur Ansammlung des Konzentrats oberhalb des Filters. Eine 10 ml Ausgangslösung wurde je nach Protein und gewünschter Endkonzentration auf 1-5 ml ankonzentriert.

2.3.2 Proteinbestimmung

2.3.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford wurden mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 bestimmt (Bradford, 1976). Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen, wahrscheinlich mit Argininresten, und bildet Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweisen, während ungebundener Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Da die Absorptionsänderung über einen großen Bereich linear von der Proteinkonzentration abhängt, ist es möglich, die Konzentration von Proteinlösungen zu ermitteln.

20 µl Proteinlösung wurde in einer 96-Lochplatte mit 100 µl Bradford-Reagenz (Sigma) versetzt und nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Readers gemessen. Anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA-Konzentration zwischen 10-150 µg Protein/ml) wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.3.2.2 Densitometrische Proteinbestimmung

Eine weitere Methode der Proteinbestimmung ist die densitometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Dazu wurden definierte Mengen der Proteine zusammen mit definierten Mengen BSA-Standard auf ein SDS-Gel geladen. Das Coomassie-Brillantblau-gefärbte Gel wurde densitometrisch ausgewertet und die Konzentrationen der Proteine konnten aus den Absorptionswerten und ihrem Molekulargewicht berechnet werden. Zusätzlich ermöglicht die Methode einen direkten Vergleich bezüglich der Qualität aller zu bestimmenden Proteine.

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine können durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Nettoladung der Proteine wird dabei durch das negativ geladene SDS kompensiert. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem Trenngel, das mit einem niedrigprozentigen Sammelgel (4%) überschichtet wurde. Die Prozentigkeit der Trenngele

richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und lag im Bereich von 7,5-13,5%.

2.3.3.1 Herstellung der Gele

Die mit Ethanol gesäuberten Glasplatten wurden zusammengebaut, das Trenngel in den durch die „Spacer“ geschaffenen Spalt gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Acrylamids wurde das Isopropanol dekantiert, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Die jeweilige Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel ist in den Tabellen 2.06 und 2.07 angegeben.

Tabelle 2.06: Zusammensetzung des Trenngels

	7,5%	10%	13,5%
Acrylamidlösung: (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	7,5 ml	10 ml	13,5 ml
Trenngelpuffer: (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
H ₂ O	14,8 ml	12,4 ml	8,9 ml
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyldiamin)	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
APS (10 % Ammoniumpersulfatlösung in H ₂ O)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Tabelle 2.07: Zusammensetzung des Sammelgels

	Volumen
Acrylamidlösung: (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	1,3 ml
Sammelgelpuffer: (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% SDS)	2,5 ml
H ₂ O	6,2 ml
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyldiamin)	0,01 ml
APS (10 % Ammoniumpersulfatlösung in H ₂ O)	0,2 ml

2.3.3.2 Elektrophorese

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5-fach Probenpuffer (375 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, 12% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol) versetzt, 5 min bei

95°C denaturiert und in die Taschen geladen. Das Gel lief in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,7, 0,1% SDS, 400 mM Glycin) zunächst bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA (Sammelgel), dann bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA (Trenngel). Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse mittels Semi-Dry-Blot auf eine Membran transferiert oder im Gel direkt mit einer Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung nachgewiesen. Dazu wurde das SDS-Gel 30-60 min in Färbelösung (10% Eisessig, 25% Isopropanol, 0,025% Coomassie-Brilliantblau) schwenkend bei RT inkubiert. Anschließend wurde mittels Entfärber-Lösung (10% Eisessig, 12,5% Isopropanol) überschüssiger Farbstoff entfernt, bis die Banden deutlich kontrastiert erkennbar waren.

Als Größenstandards diente der „high molecular weight marker“ (HMW) von Sigma.

2.3.3.3 NuPAGE-Gelelektrophorese

Die NuPAGE-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von Protein-RNA-Komplexen eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.16 und 2.3.17). Es handelt sich dabei um eine SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese unter denaturierenden, pH neutralen und nicht reduzierenden Puffer-Bedingungen (pH 7). Als Gele wurden 10% Bis-Tris NuPAGE-Gele der Firma Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese wurde nach Herstellerangaben (Invitrogen) in MOPS-Elektrophorese-Puffer (50 mM MOPS, 5 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7) durchgeführt.

2.3.4 „Western Blot“

Proteine können spezifisch mit Antikörpern im „Western Blot“ detektiert werden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektrotransfer („Semy-dry-blotting“) auf eine Nitrocellulose-Membran (PALL Corporation, Ann Arbor, USA) übertragen. Die Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Das Gel wurde in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,5 150 mM Glycin, 10% Methanol) äquilibriert und anschließend 1-2 h bei 2 mA/cm² (100 mA/Mini-Gel) geblottet.

Mittels einer durch Wasser reversiblen „Ponceau“-Rotfärbung (Sigma) wurde die Qualität des Transfers überprüft und die Banden des HMW eingezeichnet.

2.3.5 Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern

Zum Nachweis von immobilisierten Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen wurden Primärantikörper eingesetzt, die mit Hilfe von enzymgekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörpern nachgewiesen werden konnten. Hierdurch erreicht man eine Signalverstärkung, da polyklonale Antikörper mehrere Epitope eines Primärantikörpers besetzen und somit selbst geringste Proteinmengen nachgewiesen werden können.

Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver in TBST (20 mM Tris/HCl pH 8,8, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Das Magermilchpulver wurde durch kurzes Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem in 1% BSA in TBST entsprechend verdünnten Erstantikörper für 1 h bei RT. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt, bevor der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper (verdünnt in 1% BSA in TBST) für 30-60 min bei RT zugegeben wurde.

Der Blot wurde mehrmals mit TBST und einmal für mindestens 15 min mit TBST-X (1% Triton-X-100 in TBST) gewaschen.

Der Nachweis der mit Peroxidase (HRP = horseradish-peroxidase) gekoppelten Zweitantikörper erfolgte mit dem „Enhanced Chemiluminescence System“ (ECL, Amersham Bioscience, Freiburg). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst dabei Chemilumineszenz aus. Die dabei entstehende Lichtenergie schwärzt den auf den Blot aufgelegten Röntgenfilm. Zur ECL-Entwicklung wurden ECL-Lösung I und ECL-Lösung II nach Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und der Blot darin für 1 min inkubiert. Überschüssiges ECL-Reagenz wurde auf einem Whatmanpapier abgestreift. Der Blot wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und auf einen ECL-Film aufgelegt.

2.3.6 ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)

Der ELISA wurde als „solid phase binding assay“ eingesetzt, um *in vitro* die Interaktion zweier Moleküle zu untersuchen. Nach der Adsorption eines Proteins an der Oberfläche einer Mikrotiter-Platte erfolgte die Inkubation mit dem zu testenden potenziellen Liganden, der mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen wurde.

Es wurden 25 pmol Protein in Kopplungspuffer (50 mM NaHCO₃ pH 9,6 (1,59 g Na₂HCO₃ pro 1000 ml, 2,93 g NaHCO₃)) in ein Loch einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte (Greiner Microtiter/Nunc

Polysorb) adsorbiert (4°C, üN). Nicht gebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen der Platte mit 0,02% Tween-20 in PBS entfernt. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit je 200 µl 1% BSA in PBS für 2 h bei RT. Anschließend folgte die Inkubation mit dem zu untersuchenden Protein (2 h, RT). Ungebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt, gebundene Proteine wurden mittels eines spezifischen Antikörpers markiert. Der ELISA wurde durch Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers durch eine Farbreaktion entwickelt. Die Entwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (0,4 mM ABTS, 0,0 3% H₂O₂, 33 mM Citronensäure, 17 mM Natriumcitrat) und konnte im Microplate Reader (MRX, Dynatech Lab.) bei 405 nm (Referenzwellenlänge 590 nm) quantifiziert werden.

2.3.7 *In vitro* Transkription und Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden

Zur Expression radioaktiv markierter Polypeptide wurde das gekoppelte *in vitro* Transkriptions/Translationssystem der Firma Promega verwendet (TNT[®]Quick Coupled Transcription/Translation System). Dabei bindet die T7-RNA-Polymerase den T7-Promotor entsprechender Expressionsvektoren und transkribiert die klonierte cDNA. Die resultierende RNA wird im Retikulozyten-Lysat translatiert, wobei dem methioninfreien Aminosäuremix [³⁵S]-Methionin beigelegt wird. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Zur Überprüfung der Reaktion wurden 2 µl der Translationsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und in einem Autoradiogramm analysiert.

2.3.8 "Dot Overlay"

Intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen können im "Dot Overlay" nachgewiesen werden. 10-25 pmol einer Proteinlösung wurden mittels Vakuum-Spotters (Biometra, Göttingen) auf eine Nitrocellulose-Membran immobilisiert, der Transfer durch „Ponceau“-Rotfärbung überprüft und freie Bindungsstellen der Membran mit 5% Magermilchpulver in TBST (20 mM Tris/HCl pH 8,8, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20) bei RT für 1 h abgesättigt.

Nach Waschen mit TBST wurde die Membran mit 20 µl *in vitro* translatierten, radioaktivem Protein in 2 ml TBST mit 14 mM β-Mercaptoethanol für 3 h bei RT inkubiert. Nach intensivem Waschen mit TBST wurde die Membran getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

2.3.9 „Far Western“

Protein-Protein-Interaktionen wurden mittels "Far Western" analysiert. Steigende Mengen (0,4; 0,8; 1,6; 3,2 und 6,4 pmol) eines rekombinanten Proteins wurden auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit TBST mit 5% Magermilchpulver abgesättigt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 3 µg/ml eines zweiten rekombinanten Proteins. Dieses wurde durch einen monoklonalen Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen.

2.3.10 „Pulldown“

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde ein „Pulldown“ mit bromcyanaktivierter Sepharose (Amersham Bioscience) durchgeführt. Die Kopplung der Proteine an die Sepharose erfolgte nach Herstellerangaben, wobei PTB1 und BSA, welches als Negativkontrolle diente, mit einer Konzentration von 1 mg/ml kovalent an die Sepharose-"Beads" gebunden wurden. Rekombinanter Raver2 (100 pmol) wurde mit 60 µl PTB-"Beads" oder BSA-"Beads" versetzt und 1 h bei 4°C invertiert. Die "Beads" wurden im Anschluss viermal mit PTB-Puffer (20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 5% Glycerin; frisch 0,5 mM DTT und Proteaseinhibitoren 1:500) und dreimal mit 1% Tween-20 in PTB-Puffer gewaschen, mit SDS-Probenpuffer bei 95°C aufgeköcht und gelelektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ analysiert.

2.3.11 Das „Yeast Two-Hybrid“ System

Das „Yeast Two-Hybrid“ System dient dazu, *in vivo* bekannte Protein-Protein-Interaktionen näher zu charakterisieren bzw. neue Liganden eines Proteins in einer Genbank zu identifizieren („screening“). Das Prinzip basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryontische

Transkriptionsfaktoren aus zwei voneinander trennbaren Domänen bestehen: einer DNA-bindenden- und einer transkriptionsaktivierenden Domäne. Werden beide Domänen in einer Zelle getrennt exprimiert, erfolgt keine Genaktivierung, da sie nicht direkt miteinander interagieren. Gelangen beide Domänen in der Zelle wieder in enge räumliche Nähe, wird die Funktionalität des Transkriptionsfaktors rekonstituiert. Dies kann über die Expression bestimmter Reportergene nachgewiesen werden.

Bei dem eingesetzten „Matchmaker Two-Hybrid System 3“ (Clontech) werden durch den Einsatz der Vektoren pGADT7 (Aktivierungsdomäne) und pGBKT7 (DNA-Bindungsdomäne) die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 als Fusionsproteine mit den zu untersuchenden Proteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Treten Interaktionen zwischen beiden Proteinen auf, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und somit eine Expression von Reportergenen ermöglicht. Als Reportergene dienen einerseits Wachstumsmarker, die es den Hefen bei Interaktion beider Proteine ermöglichen, auf den entsprechenden Mangelmedien zu wachsen. Andererseits wurden Interaktionen über die Aktivierung des Reportergens β -Galactosidase nachgewiesen. Hefekolonien mit „Yeast Two-Hybrid“ Protein-Protein-Interaktionen zeigen im β -Galactosidase-Filtertest unter Einsatz von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactosid) eine blaue Färbung. Die Durchführung der Versuche (Transformation, Selektion, Medienzusammensetzung, β -Galactosidase-Filtertest) erfolgte analog den Angaben des „Matchmaker Two-Hybrid System“-Protokolls (Clontech).

2.3.12 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten, die zur Gesamtzellprotein-Analyse im „Western Blot“ dienen, wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) mit einem Zellschaber geerntet. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde das Zellsediment in 100 μl Lysispuffer (5 mM Tris/HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 5 mM KCl, 0,2% SDS und Proteaseinhibitoren 1:500) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Anschließend wurde die Suspension mehrmals in einer Spritze mit einer feinen Kanüle (26G) geschert und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde mit der Bradford-Proteinbestimmung bestimmt. Anschließend wurden die Extrakte mit SDS-Probenpuffer auf eine spezifische Konzentration eingestellt.

2.3.13 Herstellung von Embryoextrakten

Die Herstellung von Maus-Embryoextrakten wurde modifiziert nach Deryckere und Gannon (1994) durchgeführt. Die Maus-Embryonen wurden aus dem Uterus isoliert und in PBS gesammelt. Anschließend wurden die Embryonen im Dounce-Homogenisator in 2 ml Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,6% Nonidet-40; frisch 1 mM DTT, Proteaseinhibitoren 1:500) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, das Sediment in 500 µl Puffer B (20 mM HEPES pH 7,9, 1,2 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerin, frisch 1 mM DTT, Proteaseinhibitoren 1:500) resuspendiert und mit einer Spritze (mit einer Kanüle 20G und 26G) geschert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde mit dem vorherigen Überstand vermischt, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung wurden die Embryoextrakte mit SDS-Probenpuffer versetzt und zur Analyse im „Western Blot“ verwendet.

2.3.14 Herstellung von Gewebeextrakten

Die zu untersuchenden Gewebe wurden den Tieren entnommen und in PBS von Bindegewebe, Blut und Fett befreit. Anschließend wurden die gesäuberten Gewebe schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebe wurden mit vorgekühlten Mörsern schnell so fein wie möglich in flüssigem Stickstoff zermörsert. Je 1 g Gewebe wurde in 2 ml Extratpuffer (5 mM Tris/HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 5 mM KCl, 0,2% SDS und Proteaseinhibitoren 1:500) aufgenommen. Die Gewebeproben wurden 5 min aufgekocht und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Hinterher konnten die Gewebeextrakte mit einer definierten Menge SDS-Probenpuffer versetzt werden und für die Analyse im SDS-Gel und anschließenden „Western Blot“ verwendet werden.

2.3.15 Koimmunpräzipitation

Zur Analyse intermolekularer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen können Proteinkomplexe aus Zellen mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert werden.

Potenzielle Liganden des präzipitierten Proteins können im anschließenden „Western Blot“ spezifisch nachgewiesen und als Komponente dieses zellulären Proteinkomplexes identifiziert werden.

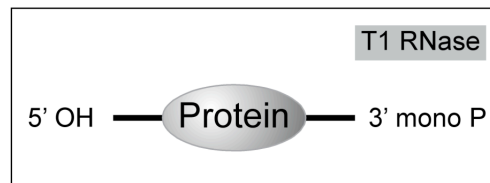
HeLa X1/5 Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen ausgesät, nach 24 h transfiziert und weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und für 30 min mit dem bivalenten, membrangängigen und reduzierbaren "Crosslinker" Dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP; 0,5 mM in PBS) bei 37°C inkubiert. Der „Crosslinker“ wurde durch Waschen mit PBS entfernt und freie aktive Gruppen wurden durch 15-minütige Inkubation mit 200 mM Glycin in PBS abgesättigt. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0,25% Desoxycholat, 1 mM EGTA) auf einer Wippe bei 4°C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, durch Ultraschallbehandlung (2 min, 80 W) vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 4°C sedimentiert (13000 rpm, 10 min). Um unspezifische Bindungen an die Sepharose zu verhindern wurde der Überstand mit 15 µl einer 1:1 Suspension Protein-G-Sepharose in Blockpuffer (2% BSA in PBS) versetzt, für 1 h unter Drehen bei 4°C inkubiert und die Sepharose bei 8000 rpm sedimentiert. Für die Immunpräzipitation wurde der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Zur Ausbildung sedimentierbarer Antikörperkomplexe wurden 40 µl der Protein-G-Sepharose Suspension zugegeben und für 1 h bei 4°C invertierend inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze fünfmal mit RIPA-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen, zur Spaltung des "Crosslinkers" 10 min in SDS-Probenpuffer bei 95°C aufgekocht und durch SDS-PAGE und „Western Blot“ analysiert.

2.3.16 „*in vivo* Cross-Linking and Immunoprecipitation Method“ CLIP

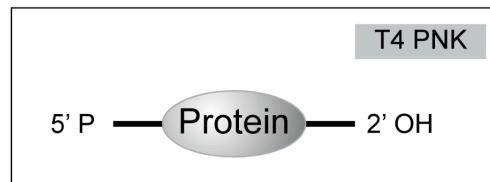
Die „*in vivo* Cross-Linking and Immunoprecipitation Method“ (CLIP) ermöglicht es, in Zellextrakten Protein-RNA-Komplexe nachzuweisen und zu analysieren (Ule et al., 2003). Sie basiert auf der Vernetzung der Protein-RNA-Komplexe in der Zelle durch die Bestrahlung mit UV-Licht. Die Protein-RNA-Komplexe werden anschließend einer RNase-Behandlung unterzogen. Dadurch entstehen kurze, durch das Protein geschützte RNA-Stücke. In einer sich anschließenden Immunpräzipitation werden die Protein-RNA-Komplexe aus dem Zelllysat präzipitiert. Nach der Immunpräzipitation findet die Markierung der gebundenen RNA mittels einer Polynukleotidkinase in Anwesenheit von [γ ³²P]-ATP statt. Nach einer Auftrennung in einem pH neutralen SDS-Gel (NuPAGE, siehe Kapitel 2.3.3.3) und dem Transfer auf eine

Nitrocellulose-Membran kann die gebundene, radioaktiv markierte RNA in einer Autoradiographie nachgewiesen werden. Die immunpräzipitierten Proteine können ebenfalls auf der gleichen Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Der schematische Ablauf der CLIP-Methode ist in Abbildung 2.01 dargestellt. Der zweite Teil der CLIP-Methode beinhaltet die Identifizierung der so genannten CLIP-„tags“. Diese stellen die vom Protein spezifisch gebundenen RNA-Sequenzmotive dar.

1. UV-Crosslink von Zellextrakten
2. Zell-Lyse
3. Partieller RNase Verdau (T1 RNase)



4. Immunpräzipitation
5. 5' RNA ³²P Phosphorylierung



6. SDS-PAGE
7. Transfer auf Nitrocellulose-Membran
8. Autoradiographie

Abbildung 2.01: Schematische Darstellung der UV-„Crosslink“ und Immunpräzipitations-Methode (CLIP). Nach dem UV-„Crosslink“ der Zellen findet die Zelllyse und der partielle RNase-Verdau statt. Es entstehen kurze, am Protein gebundene RNA-Fragmente. Die Protein-RNA-Komplexe werden über spezifische Antikörper immunpräzipitiert und die RNA mittels einer Polynukleotidkinase (PNK) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Phosphat phosphoryliert. Es folgt eine Gelelektrophorese, der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran und die Analyse durch Autoradiographie.

2.3.16.1 UV-„Crosslink“ von Zellen

Die für den Versuch eingesetzten Zellen (HeLa X1/5 oder C2C12) werden auf 15 cm Kulturschalen bis zur konfluenten Dichte kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 10 ml PBS im UV-Stratalinker (Stratagene) für 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Hierbei findet die Vernetzung der Protein-RNA-Komplexe statt. Die Zellen wurden anschließend mit einem

Zellschaber geerntet, bei 2500 rpm für 10 min sedimentiert und bei -70°C gelagert. Pro Versuchsansatz wurden 200 μl Zellsediment verwendet.

2.3.16.2 Vorbereitung der „Protein G Dynabeads“

Bei der CLIP-Methode wurden die verwendeten Antikörper zuerst an die „Beads“ gebunden. Hierzu wurde für jeden Ansatz UV-behandeltes Zelllysate und 300 μl „Protein G Dynabeads“ (DynaL-Biotech, Oslo) dreimal in PXL-Puffer (1xPBS, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholat, 0,5% Nonidet-40) gewaschen und mit dem entsprechenden Antikörper für 1 h bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurden die „Beads“ erneut mit PXL-Puffer gewaschen und konnten dann für die Immunpräzipitation eingesetzt werden.

2.3.16.3 CLIP-Immunpräzipitation

Zur Aufarbeitung der Zelllysate wurden die eingefrorenen Zellsedimente auf Eis aufgetaut, mit 400 μl PXL-Puffer (1:500 versetzt mit Proteaseinhibitoren) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Zu dem Lysat wurden 30 μl RNasin®Plus RNase Inhibitor (Promega) gegeben. Es folgte ein Verdau der DNA durch die Zugabe von 40 μl RQ1 RNase freier DNase (Promega) für 15 min bei 37°C im rotierenden Schüttler (1000 rpm). Der partielle Verdau der RNA fand durch die Zugabe von 6 μl einer 1:500 Verdünnung der T1 RNase (Fermentas) für 20 min bei 37°C unter schütteln (1000 rpm) statt. Um hochmolekulare Bestandteile wie Ribosomen und große RNPs zu entfernen, wurden die Proben in einer Mikroultrazentrifuge (TL 100, Beckmann) bei $300000 \times g$ für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf die vorbereiteten „Beads“ gegeben und 2 h bei 4°C invertiert. Nach der Inkubation wurden die „Beads“ dreimal mit PXL-Puffer und zweimal mit PNK-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , 0,5% Nonidet-40) gewaschen und in 80 μl PNK-Puffer resuspendiert. Die Markierung der am Protein gebundenen RNA wurde durch Zugabe von 80 μCi $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und 10 μl Polynukleotidkinase (Fermentas) für 20 min bei 37°C rotierend (1000 rpm) durchgeführt. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze für weitere 5 min mit 10 μl 1 mM ATP inkubiert. Um ungebundene Radioaktivität zu entfernen, wurden die „Beads“ viermal mit PNK-Puffer gewaschen und anschließend mit 30 μl NuPAGE-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel (Invitrogen) bei 70°C für 10 min inkubiert. Die Proben wurden im 10% Bis-Tris NuPAGE-Gelsystem nach Herstellerangaben (Invitrogen) elektrophoretisch in MOPS-Laufpuffer (50 mM

MOPS, 5 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die am Protein gebundene RNA wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die präzipitierten Proteine wurden durch „Western Blot“-Analysen nachgewiesen.

2.3.17 Protein-RNA UV-,Crosslink“

Der Protein-RNA UV-,Crosslink“ ist eine einfache Methode zum Nachweis von Protein-RNA-Interaktionen *in vitro*. Der Versuch wurde entweder nur mit einem rekombinanten Protein oder mit 0,5 µg PTB1 und steigenden Konzentrationen (2,5 µg –10 µg) Raver1 oder Raver2 durchgeführt. Wurden zwei Proteine eingesetzt, so wurden diese in einigen Ansätzen 30 min bei 30°C im Schüttler rotierend (1000 rpm) vorinkubiert. Die verwendete total-RNA, isoliert aus neonatalem Mausgehirn, wurde freundlicherweise von M. Fabienke (AG Arnold) zur Verfügung gestellt. In 30 µl Reaktionsvolumen wurden 0,5 µg Protein, 10 µg total-RNA, 3 µl RNasin®Plus RNase Inhibitor (Promega) und 6 µl 5xBindungs-Puffer (25 mM HEPES, pH 7,6, 125 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA, 19% (v/v) Glycerin) für 1 h bei 30°C rotierend (1000 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine 96 Lochplatte überführt und für 10 min im UV-Stratalinker (Stratagene) mit UV-Licht bestrahlt. Im Anschluss an die Vernetzung der sich gebildeten Protein-RNA-Komplexe wurden 25 µl des Reaktionsansatzes mit 0,5 µl RNase T1 (1:500 vorverdünnt, Promega) für 10 min bei 37°C rotierend (1000 rpm) inkubiert. Die am Protein gebundene RNA wurde durch die Zugabe von 20 µCi [γ ³²P]-ATP und 3 µl Polynukleotidkinase (Fermentas) bei 37°C für 20 min markiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min mit 2,5 µl 1 mM ATP. Durch die Zugabe von 9 µl NuPAGE-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel und einer Inkubation von 10 min bei 70°C wurde die Reaktion gestoppt. 30 µl des Reaktionsansatzes wurden auf ein 10% Bis-Tris NuPAGE-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen) im MOPS-Laufpuffer (50 mM MOPS, 5 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7). Die Proben wurden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und durch Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung der Protein-RNA-Bindung erfolgte über den Grad der mit [32 P]-Phosphat markierten RNA. Dazu wurden die radioaktiven Bereiche aus der Nitrocellulose-Membran herausgeschnitten und die Radioaktivität durch Cerenkov-Zählung im Szintillationszähler gemessen.

2.3.17.1 Auswertung der Protein-RNA UV-„Crosslinks“

Die Messung der eingebauten Radioaktivität erfolgte im Szintillationszähler, wobei in jeweils drei Messungen mit unterschiedlichen Messzeiten die „counts per minute“ (CPM) bestimmt wurden. Aus diesen Messungen wurde anschließend der Mittelwert gebildet und in der weiterführenden Rechnung verwendet.

Zur Berechnung der durch das Protein gebundenen RNA im UV-„Crosslink“ wurden jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche verwendet. Von den für jeden Versuch bestimmten und gemittelten CPMs wurde der Mittelwert gebildet. Die relative Bindung wurde folgendermaßen ermittelt: der Mittelwert eines Versuches (z. B. PTB1) wurde auf eins gesetzt, die CPMs der anderen Versuchsansätze wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Daraus resultierten für jeden Versuchsansatz drei Werte, aus denen der Mittelwert gebildet, die Standardabweichung berechnet und das Diagramm erstellt wurde.

2.3.18 Ribohomopolymer-Bindungstest

Die Fähigkeit der hier analysierten Proteine an Ribonukleotide zu binden, wurde mit dem Ribohomopolymer-Bindungstest (modifiziert nach Akamatsu et al., 1999) analysiert. Die verwendeten Ribohomopolymer-„Beads“ („Polyguanylic acid“ Agarose, „Polyadenylic acid“ Sepharose® 4B, „Polycytidylic acid“ Agarose und „Polyuridylic acid“ Agarose, Sigma) wurden in PBS äquilibriert. Anschließend wurden je 25 µl Ribohomopolymer-„Beads“ mit 10 pmol rekombinantem Protein in einem Volumen von 400 µl RHAP-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 2,5 mM MgCl₂, 0,5% Triton-X-100, und 0,25 M, 0,5 M oder 0,8 M NaCl) 1 h rotierend bei 4°C inkubiert. Zur Erhöhung der Stringenz der Protein-„Beads“-Bindung wurde der Versuch mit drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,25 M, 0,5 M und 0,8 M NaCl) durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die „Beads“ fünfmal mit RHAP-Puffer und der entsprechenden NaCl-Konzentration gewaschen, in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C aufgeköcht, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ analysiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Schalen in DMEM-Medium mit entsprechenden Zusätzen bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator inkubiert. Zur Passage wurden die adhärennten Zellen zunächst mit warmem 1xPBS gewaschen und dann mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis ein Großteil der Zellen vom Gefäßboden abgelöst war. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen 1:5 bis 1:20 in serumhaltigen Medium verdünnt und erneut ausgesät.

Zur Kultivierung auf Deckgläschen mussten diese zuvor beschichtet werden. Je nach Versuchsansatz und Zelllinie wurden unterschiedliche Beschichtungen angewendet, für 30-60 min bei 37°C mit steriler Fibronectin- (0,002 mg/ml), Collagen- (0,01% in 0,01 M Essigsäure) oder Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) inkubiert. Überschüssige Lösung wurde abgenommen und die Oberfläche unter UV-Licht getrocknet.

2.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeit-Konservierung wurden ca. 1×10^6 Zellen/ml nach dem Trypsinisieren in eiskaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen und langsam in Kryoröhrchen (Nunc) auf -80°C abgekühlt. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in Gewebekulturschalen plattiert.

2.4.3 Differenzierung von Zellen

Zur Differenzierung von C2C12-Zellen von Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben, wurden diese zunächst in DMEM + 10% FCS ausgesät. Waren die Zellen semikonfluent gewachsen, so wurde das Medium durch DMEM + 10% HS (Pferdeserum) ausgetauscht. Die Zellen wurden für 48-72 h weiter kultiviert, anschließend geerntet und für die Analyse im „Western Blot“ verwendet.

Neuroblastoma-Zellen lassen sich durch die Zugabe von Retinsäure oder NGF- β (Nerven-Wachstumsfaktor) differenzieren. Zur Stimulierung der N2a-Zellen wurden diese mit 1 μ M Retinsäure in MEM-Medium + 1% FCS für 72 h kultiviert. NSC-19 Zellen differenzieren in Gegenwart von 1 μ M Retinsäure in DMEM + 1% FCS oder 0,5 ng/ml NGF- β in DMEM + 1% FCS.

Die Bereitstellung der ES-Zellen Tbv und die Differenzierung der ES-Zellen mittels Retinsäurestimulierung erfolgten freundlicherweise durch M. Fabienke (AG Arnold).

2.4.4 Isolierung primärer Maus-Fibroblasten

Zur Gewinnung primärer Fibroblasten wurden zunächst Raver1-heterozygote Mäuse miteinander verpaart. Der daraus resultierende Wurf enthielt Embryonen aller drei Genotypen (Raver1-Wildtyp, heterozygote und homozygote Embryonen). Die Isolierung der Maus-Embryonen erfolgte am Embryonaltag 13,5. Nachdem die Embryonen aus dem Uterus präpariert wurden, wurden sie einzeln in mit PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gefüllte Schalen transferiert und die Innereien herausgespült. Die Köpfe der Embryonen wurden abgetrennt und für die Isolierung von genomischer DNA und zur Genotypisierung verwendet (freundlicherweise Durchgeführt von M. Fabienke, AG Arnold). In allen weiteren Schritten wurden die Embryonen einzeln behandelt. Die Vereinzelung der primären Fibroblasten erfolgte durch Auf- und Abpipettieren in 3 ml PBS (20mal). Anschließend wurden die vereinzelter Zellen für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Zur Isolation der Zellen aus ihrem Gewebeverband wurde das Sediment in 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung aufgenommen, resuspendiert und für 5 min unter gelegentlichem Schwenken bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2 ml Medium (DMEM + 10% FCS, 2% „Chicken“ Embryo Extrakt, 1% Penicillin/Streptomycin) versetzt und erneut durch Auf- und Abpipettieren (30mal) geschert. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 1000 rpm wurde das Zellsediment in 6 ml Medium resuspendiert und auf zwei collagensisierte 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

2.4.4.1 Etablierung von Zelllinien aus primären Fibroblasten

Zur Etablierung von Zelllinien wurden die zuvor isolierten, primären Fibroblasten fortlaufend kultiviert und alle 2 bis 3 Tage auf neue Zellkulturschalen transferiert. Nach mehreren Zellteilungen erreichen die Zellen eine als „Krise“ bezeichnete Phase, in der sie die Teilung

einstellen und absterben. Nur Zellen, in denen durch Mutationen das Einstellen der Proliferation verhindert wird, sind in der Lage, sich weiterhin zu teilen. Durch fortlaufende Kultivierung werden solche immortalisierte Zellklone selektiert. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Zelllinien resultierten aus mehreren Zellklonen und sind nicht monoklonal.

2.4.5 Transfektion von Zellen

2.4.5.1 Calciumphosphat-Methode

Exogene DNA, die an Calciumphosphatkristalle angelagert ist, wird von tierischen Zellen unter geeigneten Pufferbedingungen phagozytotisch aufgenommen. Gelangt transfizierte, exogene DNA in den Zellkern, erfolgt dort unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors die Transkription der eingebrachten DNA.

Die zu transfizierenden Zellen wurden ausgesät und 12-20 h in serumhaltigem Medium inkubiert. 4 h vor der transienten Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die Plasmid-DNA wurde mit 20xCaCl₂-Lösung (2,5 M CaCl₂) und tropfenweiser Zugabe von 2xHEBS-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,1) unter ständigem Mischen präzipitiert. Das Volumen eines Ansatzes richtete sich nach der Größe der eingesetzten Kulturschale und betrug 1/10 des Mediumvolumens. Nach 30-60 min wurde das Präzipitat auf die Zellen gegeben und verteilt. Die Zellen wurden nach 16 h Inkubation mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versorgt und für weitere 24 h inkubiert, bevor sie in Immunpräzipitationen oder Immunfluoreszenzen eingesetzt wurden.

2.4.5.2 Transfektion mit FuGeneTM Transfektionsreagenz

FuGeneTM Transfektionsreagenz ist ein nicht-liposomaler Lipidmix, der eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. 1 µg der gewünschten Plasmid-DNA wurden mit 100 µl serumfreien DMEM-Medium und 3 µl FuGeneTM Transfektionsreagenz für 20-30 min inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für weitere 24-48 h inkubiert und anschließend auf die Expression des transfizierten Gens hin untersucht.

2.4.6 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Für Immunfluoreszenzen müssen Zellen vor der Antikörperinkubation fixiert und permeabilisiert werden. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen wurde das Medium durch dreimaliges Waschen mit PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) entfernt. Die Fixierung erfolgte bei 37°C durch 20-minütige Inkubation mit 4% Formaldehyd in PBS. Anschließend wurde die Fixierlösung durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 0,2% Triton-X-100 in PBS 15 min permeabilisiert und nachfolgend erneut mit PBS gewaschen. Eine weitere Möglichkeit ist die Fixierung und simultane Lipidextraktion mit Methanol. Hierzu wurden die Zellen 4 min mit eiskaltem Methanol auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

2.4.7 Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode lassen sich strukturgebundene Proteine in Zellpräparaten spezifisch und mit hoher Auflösung darstellen.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Zelle wurden fixierte, permeabilisierte Zellen mit 1% BSA in PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) überschichtet und anschließend in einer feuchten Kammer mit 20 µl des entsprechenden Antikörpers in geeigneter Verdünnung 60 min bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden erneut mit 1% BSA in PBS überschichtet. Anschließend wurde 20 µl eines Fluorescein-, bzw. Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, 30-60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Zur Darstellung von Aktinfilamenten mittels direkter Fluoreszenz wurde Fluorescein-, bzw. Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin, ein Stoffwechselprodukt des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das hochspezifisch an Aktinfilamente bindet, verwendet. Dazu wurden die Zellen mit einer 10 µM Phalloidin-FITC, bzw. -TRITC Lösung inkubiert, wie bereits für die Antikörper beschrieben.

Für Kolokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt, wobei Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet wurden, die anschließend von Rhodamin-, bzw. Fluorescein-gekoppelten Antikörpern erkannt wurden.

Zur Einbettung der Fluoreszenzpräparate wurden die Deckgläschen nach den Inkubationen dreimal mit PBS gewaschen und kurz in H₂O geschwenkt. Mowiol (20 g Mowiol 4-88 Hoechst, 80 ml PBS üN bei RT rühren; + 40 ml Glycerin, üN bei RT rühren; 1 h bei 3100 x g zentrifugieren; Überstand abnehmen, bei 4°C dunkel lagern) und Bleichschutz (2,5 g n-Propylgallat, 50 ml PBS, 50 ml Glycerin, üN bei RT rühren, bei 4°C dunkel lagern) wurden im Verhältnis 3 + 1 gemischt, auf einen Objektträger aufgetropft und die Präparate mit den Zellen nach unten eingebettet. Die Präparate wurden 24 h bei RT getrocknet und unter Verwendung geeigneter Filtersätze für Rhodamin- und Fluorescein-Färbungen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Dokumentation wurden mit einer CCD-Kamera Bilder aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit MetaMorph®.

2.4.8 „Heterokaryon Assay“

Um die Funktionalität eines Kernexportsignals (NES) und den Transfer eines Proteins zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma zu untersuchen, wurde ein „Heterokaryon Assay“ durchgeführt (Michael et al., 1995, Fan und Steitz, 1998). HeLa X1/5-Zellen wurden auf Deckgläschen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen ausgesät und transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und 2×10^5 C2C12-Myoblasten, die in Gegenwart von 75 µg/ml Cycloheximid (Sigma) inkubiert wurden, wurden auf demselben Deckgläschen ausgesät. Nach Inkubation für 3 h mit 75 µg/ml Cycloheximid, um die *de novo* Proteinbiosynthese zu unterbinden, wurden die Zellen mit 50% Polyethylenglycol (PEG 3350; Sigma) für 2 min fusioniert, gewaschen und für weitere 3 h in Medium mit 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Analyse im Fluoreszenzmikroskop.

2.4.9 „Spreading Assay“

In diesem Versuch kann zum einen das Absetzverhalten und zum andern das Ausbreitungsverhalten von Zellen untersucht werden. 4×10^4 embryonale Maus Fibroblasten wurden auf Deckgläschen in einer 12 Lochplatte ausgesät. Die Deckgläschen wurden zuvor mit Collagen- oder Fibronectin-Lösung beschichtet (siehe Kapitel 2.4.1). 15, 30 und 60 min nach der Aussaat wurden die Zellen dreimal mit PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM

KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, fixiert und permeabilisiert, das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC angefärbt und das Präparat in Mowiol eingebettet.

Zur Untersuchung des Absetzverhaltens wurden alle sich auf dem Deckgläschen abgesetzten Zellen ausgezählt. Zur vergleichenden Analyse des Absetzverhaltens unterschiedlicher Zelllinien wurden die für die Wildtyp-Zelllinie ermittelte Zellzahl adhärenter Zellen auf 100% gesetzt und die Zellzahl der zu vergleichenden Zelllinien in Relation zu diesem Wert gesetzt.

Zur Untersuchung des Ausbreitungsverhaltens wurden die Zellen in drei Kategorien eingeteilt (nicht-ausgebreitet, ausgebreitet und doppeldeutige Zellen) und ausgezählt. Die quantitative Darstellung für jede der drei Kategorien erfolgte jeweils als prozentualer Anteil an der ermittelten Gesamtzellzahl.

2.4.10 „Wounding Assay“

Das Wanderungsverhalten kultivierter Zellen kann im „Wounding Assay“ untersucht werden. Dazu wurden $2\text{-}3 \times 10^5$ Zellen auf eine 3 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach 24-36 Stunden und dem Erreichen der Konfluenz, wurde mittels einer 1-10 µl Mikropipette (Roth, Karlsruhe) eine Wunde in den Zellrasen gezogen (t_0). Um das Zellteilungs-bedingte Zuwachsen der Wunde zu verhindern, wurde der Mitoseinhibitor Cytosin-β-Arabinofuranosid (AraC, Sigma) in einer Endkonzentration von 4 µM eingesetzt. Die fotografische Dokumentation erfolgte in bestimmten Zeitabständen am Inversmikroskop (Telafal 31, Zeiss) über einen Zeitraum von maximal 16 h. Die Ermittlung der in die Wunde eingewachsenen Fläche erfolgte mittels MetaMorph®, wobei die Fläche der Wunde zu Versuchsbeginn (0 h) und nach 12 h bestimmt wurde. Die daraus gebildete Differenz stellt die eingewachsene Fläche dar. Die Berechnung der µm² erfolgte über ein Referenzbild eines Größenstandards.

2.4.11 Wachstumskurve

Durch Wachstumskurven können Proliferationsraten und die Generationszeiten von verschiedenen Zelllinien ermittelt und verglichen werden, wobei die Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur stammen sollten. Von jeder zu untersuchenden Zelllinie wurden pro 3,5 cm Kulturschale 2×10^4 Zellen in DMEM + 10% FCS ausgesät. Zu Beginn der Wachstumskurve wurde von jeweils zwei Proben nach 12 h Intervallen und nach zwei Tagen in 24 h Intervallen die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Insgesamt wurde das

Wachstum der Zellen über einen Zeitraum von 8 Tagen analysiert. In diesen Zeitraum wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Die Berechnung der Verdopplungszeit (Generationszeit) der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte nach folgender Formel: $g = \lg 2 (t - t_0) / \lg N - \lg N_0$. In dieser Formel steht g für Generationszeit, N für die Zellzahl und t für die Zeit in Stunden.

2.4.12 Präparation von Myofibrillen

Zur Isolation von Myofibrillen aus den Skelettmuskeln der Maus wurde zunächst das frisch präparierte Muskelgewebe 30 min unter Rühren in einem 40-fachen Volumen Ringerlösung (100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaH₂PO₄, 5 mM EGTA, 0,1% Glucose, pH 7,4) auf Eis inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend in Rigorlösung (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0,3 mM DTT, pH 7,0) überführt (pro 0,5 g Gewebe wurden 5 ml Lösung zugesetzt) und mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Das so zerkleinerte Gewebe wurde erneut unter Rühren 10 min auf Eis inkubiert, nachfolgend bei 7000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und das Sediment in einem 10-fachen Volumen Rigorlösung aufgenommen. Die Schritte Homogenisation und Zentrifugation wurden dreimal wiederholt. Die auf diese Weise isolierten Fibrillen wurden in einer 2-fachen Rigorlösung mit 50% Glycerin aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.12.1 Färbung von Myofibrillen

Etwa 15 µl der myofibrillenhaltigen Lösung wurden auf Objektträger aufgetragen und für etwa 10 min ohne Erschütterung inkubiert, so dass sie sich auf dem Glas absetzten konnten. Für die Fixierung mit Formaldehyd wurden die Myofibrillen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Formaldehyd überschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Myofibrillen für 2 h mit 5% BSA in PBS abgesättigt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Myofibrillen mit dem in PBS verdünnten Erstantikörper. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und die Myofibrillen für 45 min mit dem ebenfalls in PBS verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Myofibrillen in Mowiol eingebettet. Die Analyse der Myofibrillen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zellbiologische Untersuchungen an Raver1-defizienten Zellen und Geweben

Mäuse, in denen das Raver1-Gen inaktiviert wurde, weisen keine auffälligen phänotypischen Besonderheiten auf. Dies lässt darauf schließen, dass Raver1 kein für die Ontogenese essenzielles Protein ist. Während der Organismus das Fehlen eines Proteins tolerieren kann, könnte sich die Raver1-Defizienz auf zellulärer Ebene durchaus bemerkbar machen. Es sollten daher Zelllinien von Wildtyp-Zellen sowie heterozygoten und homozygoten Zellen hergestellt und analysiert werden.

3.1.1 Analyse Raver1-defizienter Gewebe

Für die Analyse der Inaktivierung des Raver1-Gen in der Maus ist es essenziell zu beweisen, dass die Modifikation des Gens zu einer vollständigen Deletion des Proteins geführt hat. Aufgrund der Erfahrung mit der hypomorphen Raver1-Mutante (siehe Kapitel 1.4.4) sollte zunächst der Erfolg des „Knock outs“ von Raver1 überprüft werden. Hierzu wurden „Western Blot“-Analysen verschiedener Gewebe unter besonderer Berücksichtigung der Muskulatur mit einem gegen den N-Terminus (5G6) und zwei gegen den C-Terminus gerichteten monoklonalen Raver1-Antikörper (7D3 und 5D5) durchgeführt. Die Lage der von diesen Antikörpern erkannten Epitope war bekannt (Dissertation A. Zieseniß, 2005). Das Epitop des N-terminalen Raver1-Antikörper 5G6 liegt innerhalb der ersten drei Exone und ist durch die homologe Rekombination des Raver1-„Knock out“-Konstrukts deletiert. Die Epitope der C-terminalen Raver1-Antikörper liegen nicht in dem durch das „Knock out“-Konstrukt deletierten Bereich, hier sollte aufgrund der Inaktivierung des gesamten Raver1-Gens ebenfalls kein Protein nachweisbar sein. In „Western Blot“-Analysen konnte für keinen der drei Raver1-Antikörper ein Signal detektiert werden (siehe Abbildung 3.01 und Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die Inaktivierung des Raver1-Gens zum Verlust des Raver1-Proteins führte.

Darüber hinaus wurde in „Western Blot“-Analysen untersucht, ob es durch den Verlust von Raver1 zu einer Veränderung im Expressionsmuster der cytoplasmatischen Liganden kommt. Es wurden überwiegend Muskelgewebe untersucht, da die Vinculin-Isoform Metavinculin nur im

Muskel durch alternatives Spleißen des Vinculin-Gens erzeugt wird (Witt et al., 2004) und Vinculin wie Metavinculin als Raver1-Liganden identifiziert waren (Hüttelmaier et al., 2001). Vinculin und Metavinculin, die von dem hier eingesetzten Vinculin-Antikörper beide erkannt werden, zeigten keine Veränderung der Expression und Verteilung zwischen Wildtyp und Mutante. Ebenso konnte keine Änderung der Expression und des Spiegels von α -Actinin und Aktin, zweier weiterer Raver1-Liganden im Vergleich zwischen Wildtyp zur Mutante gefunden werden. Neben diesen etablierten Raver1-Liganden wurde das Expressionsmuster von Tropomyosin analysiert, da Raver1 möglicherweise an der Prozessierung der Tropomyosin mRNA beteiligt ist. Der verwendete Tropomyosin-Antikörper erkennt mehrere Tropomyosin-Isoformen, die sich im SDS-Gel in nur zwei Banden aufspalten, aber deutlich mehr Isoformen enthalten können. An dieser Stelle kann daher nur zwischen „großen“ und „kleinen“ Isoformen unterschieden werden (Boyd et al., 1995, Gimona et al., 1997). Mit diesem Antikörper konnte auch für Tropomyosin kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante entdeckt werden (siehe Abbildung 3.01).

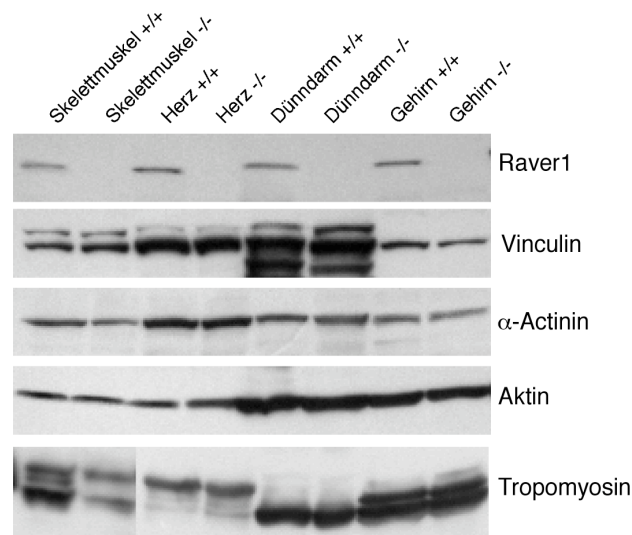


Abbildung 3.01: Die cytoplasmatischen Raver1-Liganden und Tropomyosin zeigen eine unveränderte Expression in Raver1-defizienten Mausgeweben. Proteinextrakte von Wildtyp (+/+) und homozygoten (-/-) Mäusen, hergestellt aus adultem Skelettmuskel, Herz, Dünndarm und Gehirn wurden im „Western Blot“ analysiert. Raver1 wurde mit dem monoklonalen Raver1-Antikörper 5G6 nachgewiesen. Vinculin und seine größere, muskelspezifische Variante Metavinculin wurde mit dem monoklonalen Vinculin-Antikörper hVin1 detektiert. Der Nachweis von α -Actinin und Aktin erfolgte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern. Die „großen“ und „kleinen“ Tropomyosin-Isoformen sind in diesem „Western Blot“ mit dem monoklonalen Tropomyosin-Antikörper nachgewiesen und erscheinen als Doppelbanden.

Während der Differenzierung von Skelettmuskel kommt es zur Translokation von Raver1 aus dem Zellkern an sarkomere Strukturen. In Skelettmuskelgefrierschnitten kolokalisiert Raver1 mit

Vinculin und α -Actinin in den Bereichen der Z-Linie (Hüttelmaier et al., 2001). Eine detailliertere Lokalisation von Raver1 konnte mit isolierten Myofibrillen durchgeführt werden und zeigte Raver1 als Komponente der I-Z-I-Region (Dissertation A. Zieseniß, 2005). Da Raver1 somit ein integraler Bestandteil des Sarkomers von Wildtyp-Mäusen ist, wurde die Struktur und Organisation von Myofibrillen, isoliert aus Raver1 homozygoten und heterozygoten adulten Maus-Skelettmuskel, im Vergleich zum Wildtyp analysiert.

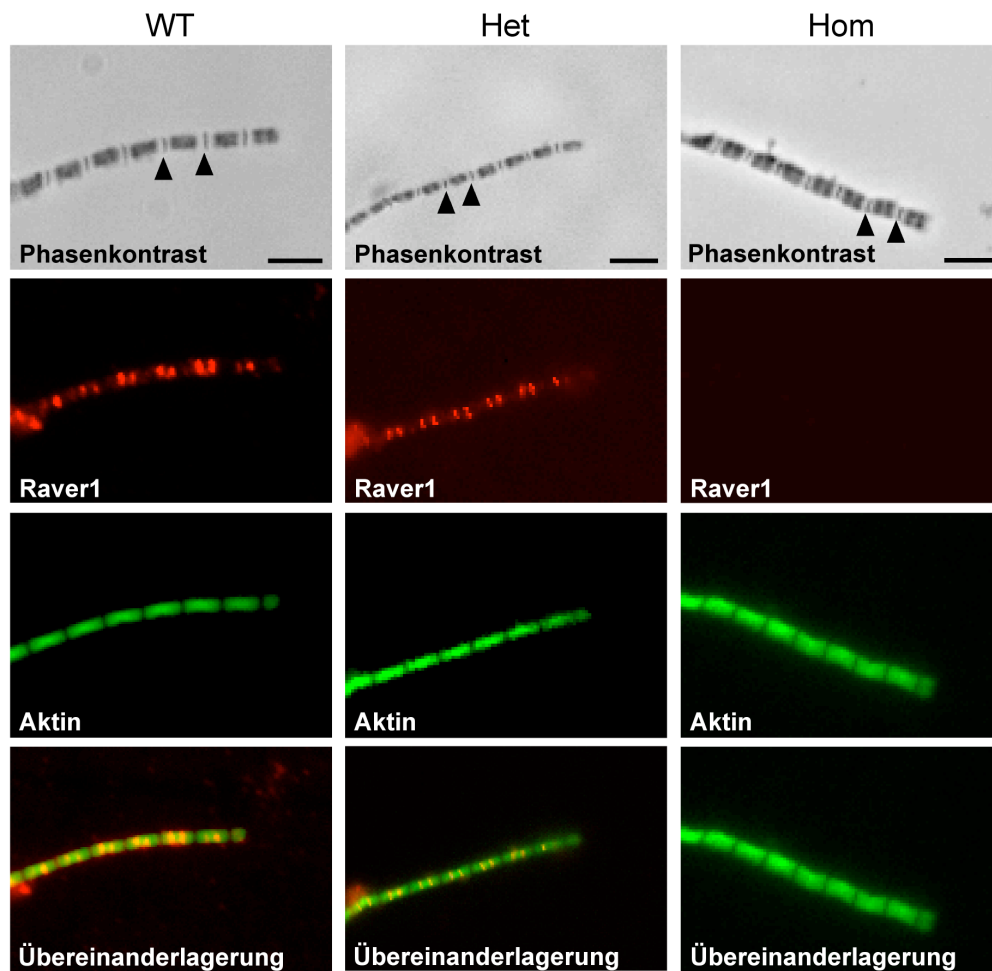


Abbildung 3.02: Charakteristische Raver1-Lokalisation im I-Z-I-Bereich von Myofibrillen. Wildtyp (WT, links), heterozygote (Het, Mitte) und homozygote (Hom, rechts) Skelettmuskel-Myofibrillen sind oben im Phasenkontrast abgebildet. Die Pfeilspitzen markieren die Z-Linie. Die Lokalisation von Raver1 wurde mit dem monoklonalen Raver1-Antikörper 5G6 und einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper (Cy3) nachgewiesen (2. Zeile). Aktin wurde mittels Phalloidin-FITC markiert (3. Zeile). Die Übereinanderlagerung der Bilder ist unten dargestellt. In Wildtyp-Myofibrillen ist eine deutliche Doppelbande für Raver1 erkennbar, die mit Aktin im Bereich der I-Z-I-Banden-Region kolokalisiert. Myofibrillen aus Raver1 $-/-$ Muskeln enthalten kein Raver1-Protein. Die Balken entsprechen 5 μ m.

Der Nachweis von Raver1 in Myofibrillen, isoliert aus Wildtyp und heterozygotem Skelettmuskel, bestätigt die Lokalisation in der I-Z-I-Banden-Region (Dissertation A. Zieseniß,

2005). Die Färbung von Aktin mittels Phalloidin-FITC präsentiert deutlich die I-Banden-Region der Myofibrillen, die in der Phasenkontrastaufnahme als helle Bande mit zentraler dunkler Z-Linie erscheint. Die Übereinanderlagerung beider Färbungen veranschaulicht die Lokalisation von Raver1 in der I-Z-I-Banden-Region in enger Nähe zur Z-Linie. In homozygoten Myofibrillen ist keine Färbung durch den Raver1-Antikörper erkennbar (siehe Abbildung 3.02).

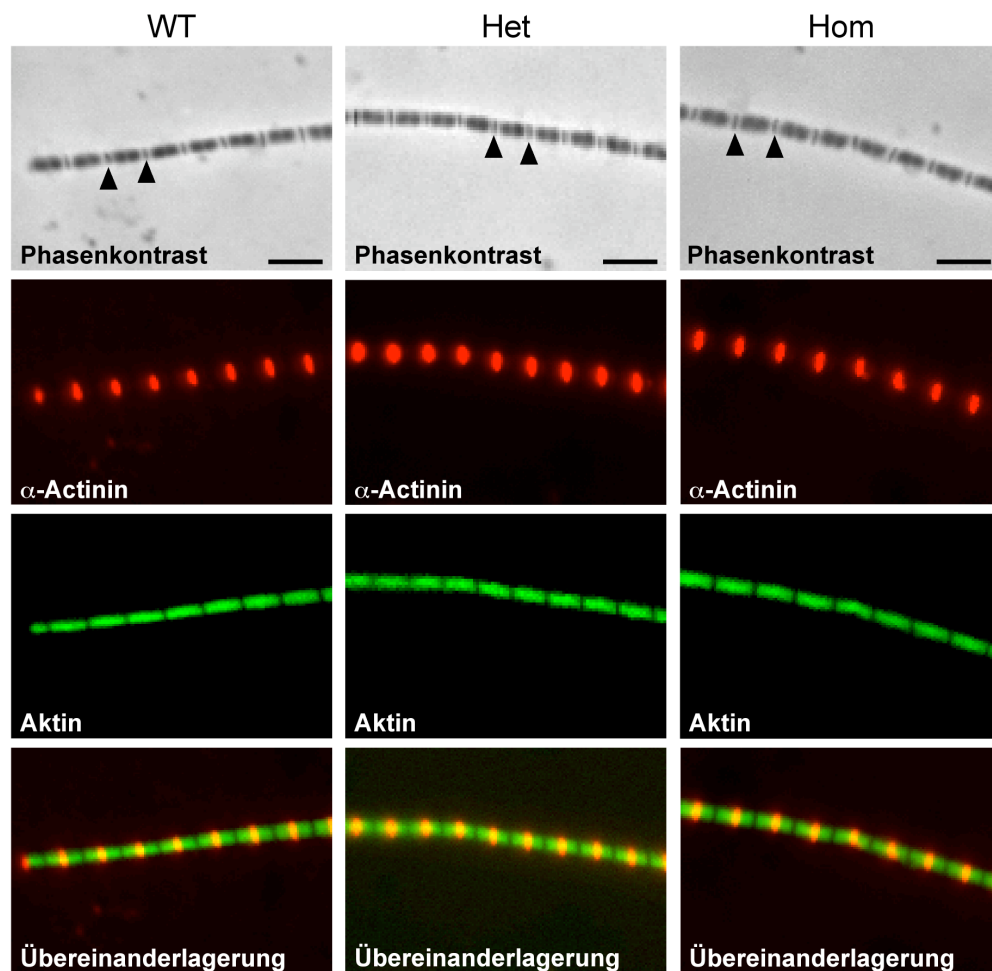


Abbildung 3.03: Raver1-defiziente Myofibrillen zeigen keine grobe Strukturveränderung. Myofibrillen, isoliert aus Wildtyp (WT, links), heterozygoten (Het, Mitte) und homozygoten (Hom, rechts) Skelettmuskel sind als Phasenkontrastaufnahmen oben dargestellt, wobei die Z-Linien mit Pfeilspitzen markiert wurden. α -Actinin wurde mit dem monoklonalen α -Actinin-Antikörper (2. Zeile) und einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper (Cy3) angefärbt. Aktin wurde mittels Phalloidin-FITC (3. Zeile) markiert. Die Übereinanderlagerung der Bilder ist unten abgebildet, wobei eine deutliche Färbung von α -Actinin in der Z-Linie und einer Markierung der I-Banden-Region durch Aktin erkennbar ist. Die Balken entsprechen 5 μm .

Die Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen α -Actinin zeigt, dass Raver1-defiziente Myofibrillen eine normale Organisation der Strukturproteine besitzen: die I-Bande und die Z-

Linie zeigen keinen Unterschied zum Wildtyp (siehe Abbildung 3.03). Die Analysen der Myofibrillen bestätigt, dass Raver1 ein integraler Bestandteil des Sarkomers ist, aber keine essenzielle Strukturkomponente ist.

3.1.2 Zelluläre Analysen

Zur Analyse des Raver1-„Knock outs“ auf zellbiologischer Ebene wurden Raver1-defiziente Zelllinien im Vergleich zu Wildtyp- und heterozygoten Zellen benutzt. Dazu wurden primäre Fibroblasten aus Embryonen des Embryonaltages 13,5, die aus einer Verpaarung zweier heterozygoten Raver1-Mäuse resultierten, isoliert. Die Genotypisierung der aus jedem einzelnen Embryo isolierten primären Fibroblasten wurde freundlicherweise von M. Fabienke (AG Arnold) durchgeführt.

Die Herstellung von Zelllinien aus primären Fibroblasten der Maus wird dadurch erleichtert, dass Nagerzellen, im Gegensatz zu humanen Zellen, eine relativ hohe Rate spontaner Immortalisierungen aufweisen, die häufig auf Mutationen im p53-Gen zurückzuführen sind (Harvey und Levine, 1991) und wahrscheinlich auch durch eine persistente Telomeraseaktivität in diesen Zellen begünstigt wird (Newbold, 1997). Es gelang auch hier, primäre Fibroblasten fortwährend über einen Zeitraum von drei Monaten zu kultivieren und zu vermehren. Während die meisten Zellen ihre Proliferation nach wenigen Passagen einstellen, waren einige Zellen in der Lage, diese als „Krise“ bezeichnete Phase zu überwinden und sich weiter zu teilen. Diese spontan immortalisierten Zellen, die ursprünglich aus einem Mausembryo stammten, werden als „Zelllinie“ bezeichnet, obwohl sie nicht monoklonal sind, sondern aus einer kleinen Population spontan immortalisierter Zellen entstanden sind. Um in den folgenden Analysen der Zelllinien sicherzustellen, dass eventuelle Unterschiede auf den Verlust von Raver1 zurückzuführen sind und nicht aufgrund der Eigenschaften der Zelllinien entstehen und somit auf einer spontanen klonalen Selektion beruhen, wurden zwei homozygote Zelllinien aus zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen gewählt (Hom1 und Hom2 genannt) und im Vergleich zu einer heterozygoten Zelllinie und einer Wildtyp-Zelllinie analysiert.

3.1.2.1 Expressionsanalysen Raver1-assoziiierter Proteine in Wildtyp und Raver1-defizienten Zelllinien

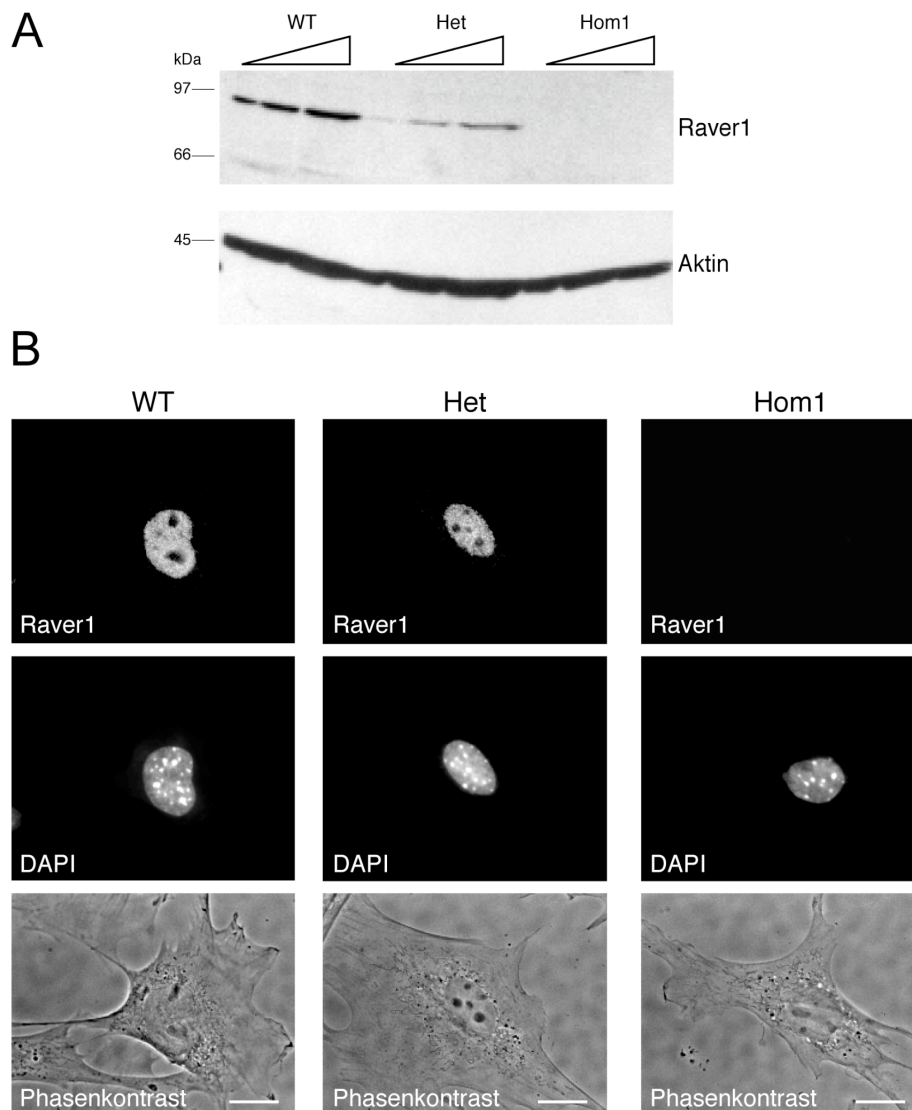


Abbildung 3.04: Endogenes Raver1-Protein ist in Raver1-defizienten primären Fibroblasten nicht nachweisbar. Die Analyse des endogenen Raver1-Proteins erfolgte in Zellextrakten aus Wildtyp (WT), Raver1-heterozygoten (Het) und Raver1-homozygoten (Hom1) primären Fibroblasten mit dem monoklonalen Raver1-Antikörper 7D3 (A). Es wurden jeweils 5, 15 und 30 μg Zellextrakt im „Western Blot“ analysiert. Die Lokalisation von Raver1 wurde in Immunfluoreszenzen mit dem Raver1-Antikörper 7D3 analysiert (B, obere Reihe). Links sind Wildtyp (WT), in der Mitte heterozygote (Het) und rechts homozygote (Hom) primäre Fibroblasten dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI markiert (B, mittlere Reihe), die Zellen sind im Phasenkontrast (B, untere Reihen) abgebildet. Die Balken entsprechen 10 μm.

In initialen Analysen der generierten Zelllinien wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von Raver1 untersucht (siehe Abbildung 3.04). Die vergleichende Analyse der Raver1-Expression im „Western Blot“ bestätigt das Fehlen von Raver1. In heterozygoten

Zellextrakten war deutlich weniger Raver1 vorhanden als im Wildtyp. In Immunfluoreszenzen ist eine deutliche Kernfärbung von Raver1 in Wildtyp- und heterozygoten Zellen zu erkennen. In Raver1-defizienten Zellen ist wie erwartet keine Raver1-Färbung nachweisbar. Auf den Phasenkontrastaufnahmen sind keine morphologischen Unterschiede zwischen den Zelltypen erkennbar (siehe Abbildung 3.04).

Die Expression Raver1-assoziiierter Proteine wurde ebenfalls im „Western Blot“ vergleichend untersucht. Eine Zusammenstellung der „Western Blot“-Analysen ist in Abbildung 3.05 gezeigt. Die vorher ermittelten Genotypen der unterschiedlichen Zelllinien wurden wiederum durch einen Raver1-Proteinnachweis bestätigt. In der Wildtyp-Zelllinie (WT) ist eine deutliche Expression von Raver1 detektierbar, in der heterozygoten Zelllinie (Het) ist eine schwächere und in den homozygoten Zelllinien (Hom1 und Hom2) keine Raver1-Expression nachweisbar.

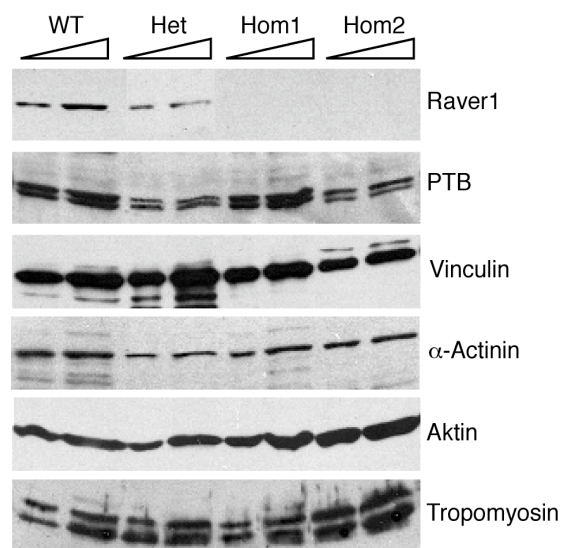


Abbildung 3.05: Unveränderte Expression der Raver1-Liganden und Tropomyosin in Raver1-defizienten Zelllinien. In den „Western Blot“-Analysen wurden jeweils 15 µg und 30 µg Gesamtproteinextrakt aus Raver1-Wildtyp- (WT), heterozygoten- (Het) und homozygoten (Hom1 und Hom2) Zelllinien analysiert. Der Nachweis von Raver1 erfolgte mit dem monoklonalen Raver1-Antikörper 7D3. α-Actinin wurde mit dem polyklonalen α-Actinin-Antikörper und Vinculin mit dem monoklonalen Vinculin-Antikörper hVin1 analysiert. Die „großen“ und „kleinen“ Tropomyosin-Isoformen sind als Doppelbanden sichtbar, die von dem verwendeten Tropomyosin-Antikörper erkannt werden. Die Detektion von PTB und Aktin erfolgte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern.

Die Analyse der Expression des Kernliganden von Raver1, PTB, erfolgte mit dem polyklonalen PTB-Antikörper. Dieser Antikörper detektiert mehrere Proteinisofomern des PTB, was vermutlich der Grund für das Auftreten von Doppelbanden in den „Western Blots“ ist. Das PTB-Expressionsmuster unterscheidet sich nicht zwischen Extrakten von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Zellen. Der Nachweis der cytoplasmatischen Raver1-Liganden, α-Actinin und

Vinculin, erfolgte mit einem spezifischen α -Actinin bzw. Vinculin-Antikörper. Für α -Actinin ist in allen vier analysierten Zelllinien eine identische Expression nachweisbar. Für Vinculin sind zwischen der Wildtyp-, heterozygoten und einer homozygoten Zelllinien ebenfalls keine Unterschiede in der Expression erkennbar. Die Expressionsstärke von Aktin und die Verteilung der Tropomyosin-Isoformen sind ebenfalls in den vier analysierten Zelllinien annähernd identisch. Zusammenfassend lässt sich anhand der „Western Blot“-Analysen der Zelllinien sowie der Gewebe erkennen, dass das Expressionsmuster der Raver1-Liganden und Tropomyosin durch den Verlust von Raver1 in der Zelle und im Gewebe nicht sichtbar beeinflusst wird.

3.1.2.2 Vergleichende Darstellung der Zellmorphologie von Wildtyp- und Raver1-defizienten Zelllinien

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse der Zellmorphologie (siehe Abbildung 3.06). Zur vergleichenden Untersuchung der Zellmorphologie der Raver1-Wildtyp- und Raver1-defizienten Zelllinien wurde überwiegend die Struktur des Cytoskeletts analysiert, da Raver1 zum einen mit mikrofilamentassoziierten Proteinen interagiert und zum anderen das Mikrofilamentsystem wesentlich an der Ausbildung der Zellmorphologie beteiligt ist.

Die Darstellung des Mikrofilamentsystems erfolgte durch die Markierung von filamentösem Aktin mit Phalloidin-TRITC. In allen vier analysierten Zellen sind Stressfasern zu erkennen. Nichtfilamentöses Aktin wurde mit dem monoklonalen Antikörper 2G2 sichtbar gemacht, der nicht an Aktinfilamente bindet (Gonsior et al., 1999). In den Zellen aller drei unterschiedlichen Raver1-Genotypen ist die Anreicherung dieser Aktinfraktion im Bereich der Führungslamelle zu erkennen, wo es an dynamischen Prozessen der Zellbewegung teilnimmt (Pollard und Borisy, 2003). Die Zelladhäsionsverbindungen wurden durch die Anfärbung von Vinculin analysiert. Die ausgeprägte Struktur der Fokalkontakte, die zur Verankerung der Mikrofilamente an der Plasmamembran dienen und in denen Vinculin spezifisch lokalisiert, ist in allen vier untersuchten Zelllinien erkennbar. Die vergleichende Darstellung der Mikrotubuli-Organisation zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Zellen. Der Nachweis des Aktin-assoziierten Proteins Tropomyosin ist ähnlich der Färbung von filamentösem Aktin und ist zwischen Wildtyp- und Raver1-defizienten Zellen identisch. Zur Darstellung der Zellkerne wurde LaminB, welches eine Komponente der Kernlamina ist, mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. In Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Zellen ist eine identische Struktur der Zellkerne erkennbar.

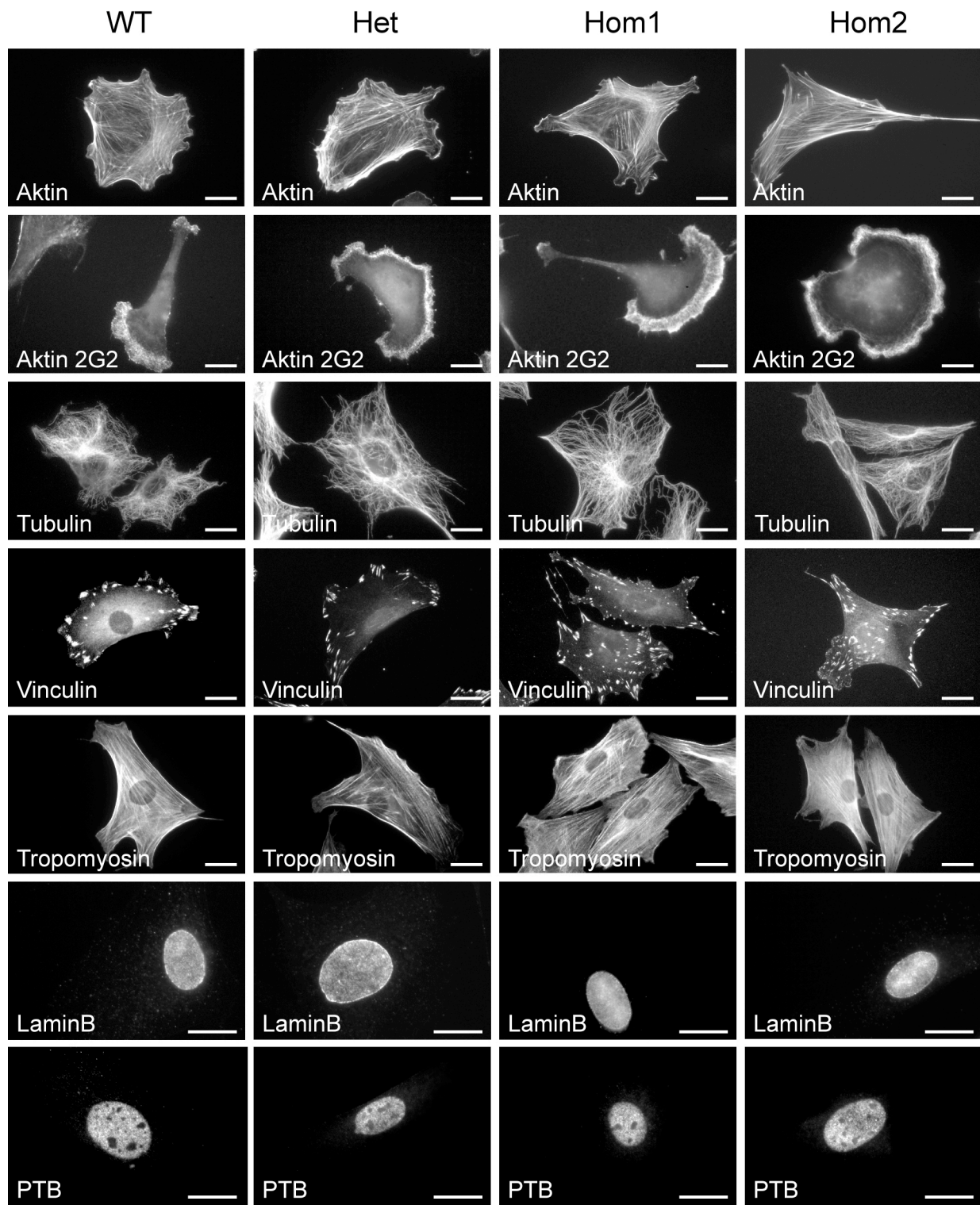


Abbildung 3.06: Cytoskelettstruktur von Raver1-Wildtyp und Raver1-defizienten Zelllinien. Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC markiert (Aktin). Die anderen Strukturkomponenten des Cytoskeletts wurden mit spezifischen Antikörpern und einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper (Cy3) nachgewiesen. Nichtfilamentöses Aktin wurde mit dem 2G2 Antikörper (Aktin 2G2) markiert. Vinculin, Tubulin, Tropomyosin und LaminB, eine Komponente der inneren Kernhülle, wurden jeweils mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis von PTB erfolgte mit einem polyklonalen PTB-Antikörper. Es wurde eine Raver1-Wildtyp (WT), heterozygote (Het) und zwei homozygoten Zelllinien (Hom1 und Hom2) analysiert. Die Balken entsprechen 10 μm .

Der Nachweis der subzellulären Lokalisation von PTB, dem Kernliganden von Raver1, zeigt eine diffuse Verteilung von PTB im Nukleoplasma mit Aussparung der Nukleoli und ist zwischen Wildtyp und Raver1-defizienten Zellen identisch. Die verschiedenen Immunfluoreszenzen veranschaulichen die fibroblastoide Morphologie der unterschiedlichen Zelllinien. Es lassen sich jedoch anhand der vergleichenden Darstellungen der Zellmorphologie und der unterschiedlichen Komponenten des Cytoskeletts keine morphologischen und strukturellen Unterschiede zwischen den Raver1-Wildtyp- und den Raver1-defizienten Zelllinien erkennen.

3.1.2.3 Vergleichende Analysen der Proliferation, Migration und Adhäsion von Wildtyp und Raver1-defizienten Zelllinien

Kultivierte Zellen weisen unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf. Diese können mit Hilfe von Wachstumskurven dargestellt werden, wodurch die Proliferationsrate der Zellen ermittelt werden kann. Von allen Zelllinien wurden Proliferationsanalysen durchgeführt, wobei 2×10^4 Zellen in 3,5 cm Kulturschalen ausgesät wurden und die Zellzahl über einen Zeitraum von acht Tagen täglich bestimmt wurde. In Abbildung 3.07 ist exemplarisch für jede Zelllinie eine Wachstumskurve dargestellt. Die Generationszeiten der unterschiedlichen Zelllinien wurden aus der Wachstumskurve ermittelt (siehe Kapitel 2.4.11) und sind in der Legende aufgelistet.

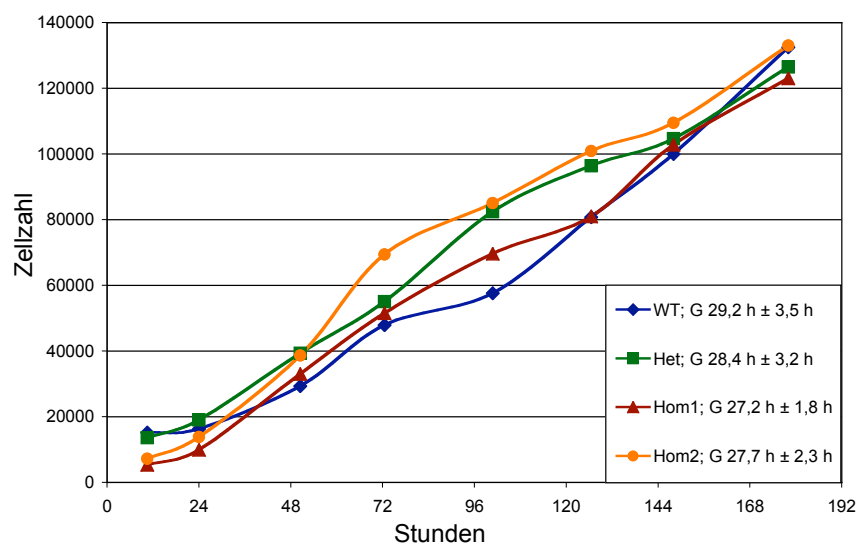


Abbildung 3.07: Raver1-Wildtyp und Raver1-defiziente Zelllinien zeigen ein identisches Wachstumsverhalten. Pro Zelllinie (Wildtyp (WT), heterozygot (Het), homozygot, (Hom1 und Hom2)) ist jeweils eine Wachstumskurve dargestellt. Die Zellen der Wachstumskurven wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert und verliefen über einen Zeitraum von acht Tagen. Die aus der Wachstumskurve ermittelten Generationszeiten sind in der Legende für die jeweilige Zelllinie aufgelistet.

Innerhalb der ersten 24 Stunden ist das verzögerte Anlaufen (Lag-Phase) des Zellwachstums zu erkennen. Die Log-Phase stellt die konstante Verdopplungszeit der Zellen dar. Die stationäre und die Absterbphase der Zellen wurden hier nicht ermittelt. Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass der Verlust von Raver1 in der Zelle keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Die aus der Wachstumskurve ermittelten Generationszeiten sind für die hier untersuchten Zelllinien fast identisch und betragen zwischen 27 und 30 Stunden.

Das Absetzverhalten sowie das anschließende Ausbreiten der Zellen und die damit verbundene Fähigkeit der Zellen, Zell-Matrix-Kontrakte zu bilden, kann in Zelladhäsions- und Ausbreitungs-Analysen untersucht werden.

Eine identische Anzahl von Zellen wurde auf Deckgläschen ausgesät, die zuvor mit unterschiedlichen Matrices beschichtet worden waren und 30 min inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden nicht adhärente Zellen durch Waschen entfernt und anschließend erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Das Aktin-Cytoskelett wurde zur Auswertung der Zellen mit Phalloidin-TRITC angefärbt. Zur Analyse der Zelladhäsion wurden die Zellen mit dem 10xPlan-Fluar Objektiv analysiert und fotografiert. Die Anzahl der abgesetzten Zellen resultiert aus der Auszählung von 20 willkürlichen Gesichtsfeldern und einer Zahl von 400-600 Zellen in vier unabhängigen Versuchen. Die Quantifizierung der Zelladhäsion ist in Abbildung 3.08 dargestellt. Die für den Wildtyp ermittelten durchschnittlichen Zellzahlen adhärenter Zellen wurde gleich 100% gesetzt und die Zellzahlen für die beiden Raver1-defizienten Zelllinien (Hom1 und Hom2) in Relation zu diesem Wert gesetzt.

Sowohl auf Collagen als auch auf Fibronectin war nach 30 min keine signifikante Veränderung im Absetzverhalten zwischen den Zelllinien zu beobachten. Zwar wurden für beide untersuchten Raver1-defizienten Zelllinien vom Wildtyp leicht abweichende Werte ermittelt, die jedoch einmal jeweils niedriger (Hom1) oder höher (Hom2) lagen und daher eher auf die klonalen Unterschiede, denn auf das Fehlen von Raver1 zurückzuführen sind.

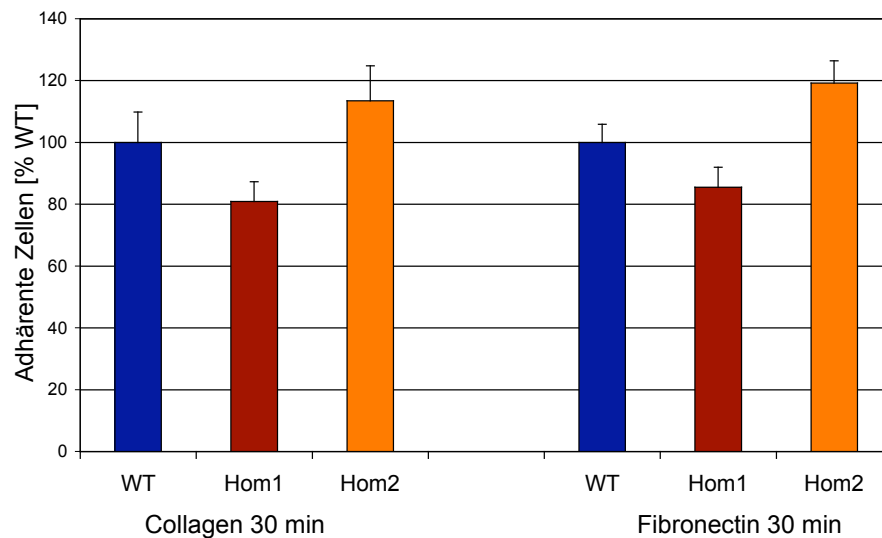


Abbildung 3.08: Raver1-Wildtyp (WT) und Raver1-defiziente Zelllinien (Hom1 und Hom2) zeigen kein unterschiedliches Absetzverhalten. 5×10^4 Zellen wurden auf Collagen oder Fibronectin beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 30 min gewaschen, fixiert, permeabilisiert und Aktin mit Phalloidin-TRITC angefärbt. In vier unabhängigen Versuchen wurden je 400-600 Zellen in 20 willkürlichen Gesichtsfeldern ausgezählt, wobei die daraus resultierenden Mittelwerte mit berechneter Standardabweichung dargestellt sind. Die Auswertung der Zelladhäsion ist als Proportion von adhären Zellen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

In der vorangegangenen Analyse zum Absetzverhalten von Zellen wurde nur die Adhäsion, jedoch nicht das als „Spreading“ bezeichnete Ausbreiten der Zellen berücksichtigt. Um das Ausbreitungsverhalten der Raver1-Wildtyp und Raver1-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden „Spreading“-Analysen durchgeführt. Das Ausbreitungsverhalten der Zellen wurde zum einen auf Collagen- und zum anderen auf Fibronectin beschichteten Deckgläschen analysiert. Es wurde eine identische Anzahl an Zellen ausgesät und nach 30 min Inkubation gewaschen, fixiert, permeabilisiert und das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC markiert. Zur Auswertung wurden die Zellen anhand ihrer über das Aktin-Netzwerk ermittelten Morphologie in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe: ausgebreitet (A), beinhaltet flache Zellen mit einem gut entwickelten Aktin-Netzwerk. Dieser Gruppe steht die Gruppe der nicht ausgebreiteten Zellen (N) gegenüber: mit Zellen, die sich zwar angeheftet, aber noch nicht ausgebreitet haben. Als doppeldeutig (D) wurden Zellen gewertet, die in keine der beiden Gruppen eingeordnet werden konnten.

Die quantitative Darstellung für jede der drei Gruppen (siehe Abbildung 3.09) erfolgte jeweils als prozentualer Anteil an der ermittelten Gesamtzellzahl. Diese Analyse wurde vergleichend für die Wildtyp-Zelllinie und beide homozygoten Zelllinien (Hom1 und Hom2) durchgeführt. Auch im Ausbreitungsverhalten aller drei Zelllinien gab es keine nennenswerten Unterschiede. Auch

hier zeigten die beiden Raver1-defizienten Zelllinien eine leichte Variation, die aber im Vergleich zu der Wildtyp-Zelllinie nicht signifikant war. Generell war jedoch eine bessere Ausbreitung der Zellen auf Collagen als auf Fibronectin zu beobachten. Während bei Collagen nach 30 min etwa 70% der Zellen eine deutliche ausgebreitete Morphologie aufwiesen, waren es bei Fibronectin nur knapp die Hälfte.

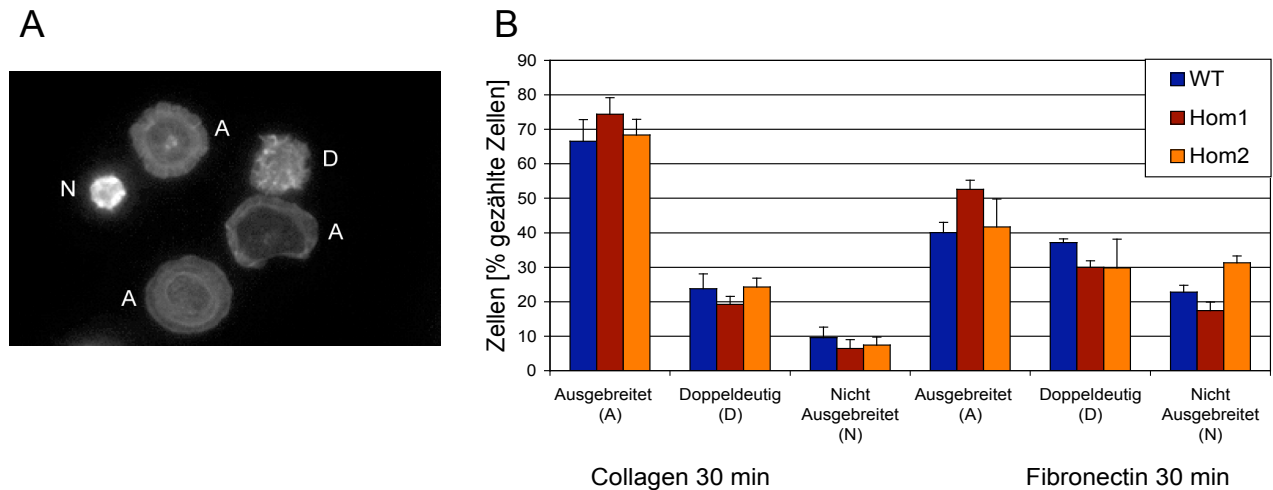


Abbildung 3.09: Ausbreitungsverhalten von Raver1-Wildtyp- (WT) und Raver1-defizienten Zelllinien (Hom1 und Hom2). 5×10^4 Zellen wurden auf Collagen bzw. Fibronectin beschichteten Deckgläsern ausgesät und nach 30 min fixiert. Nach der Permeabilisierung folgte die Färbung des Aktin-Cytoskeletts mit Phalloidin-TRITC. Für die Auswertung wurden die Zellen in drei Kategorien eingeteilt. In Abbildung A ist exemplarisch die Einteilung der Kategorien dargestellt, wobei A (Ausgebreitet) große, flach ausgebreitete Zellen zeigt, D (Doppeldeutig) beschreibt doppeldeutige Zellen, die weder nicht ausgebreitet noch ausgebreitet sind und mit N (Nicht Ausgebreitet) sind kleine kompakte Zellen gekennzeichnet. Abbildung B zeigt die relativen Anteile der drei Kategorien an der Gesamtzellzahl. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt und jeweils ca. 400-600 Zellen analysiert. Die Balken sind die Mittelwerte mit berechneter Standardabweichung.

Die gerichtete Bewegung von Zellen erfordert einen koordinierten Auf- und Abbau des Mikrofilamentsystems. In einem „Wounding Assay“ sollte das Migrationsverhalten der Raver1-defizienten Zelllinien im Vergleich zur heterozygoten Zelllinie und zum Wildtyp analysiert werden. Durch Blockierung der Mitose mit Cytosin- β -Arabinofuranosid wurde ausgeschlossen, dass Zellvermehrung dabei eine Rolle spielt. Dabei wurde das Einwandern der Zellen in eine Wunde, die in einen konfluenten Zellrasen gezogen wurde über einen Zeitraum von 12 h dokumentiert, indem die gleiche Region der Wunde zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert wurde. Zur Auswertung der „Wounding“-Analyse wurde die Fläche der Wunde nach 0 h und 12 h bestimmt und die Differenz ermittelt, die die in die Wunde eingewachsene Fläche darstellt (siehe Kapitel 2.4.10). Je höher die Migrationsrate der Zellen ist, desto schneller wird die Wunde

geschlossen. In Abbildung 3.10 ist exemplarisch für jeden analysierten Genotypen eine Wunde dargestellt. Die Ermittlung der eingewachsenen Fläche verdeutlicht, dass zwischen Raver1-Wildtyp- und Raver1-defizienten Zellen keine Unterschiede hinsichtlich der Zellmigration detektierbar sind. Innerhalb von 12 h verkleinert sich die Wunde bei allen vier analysierten Zelllinien um ca. 300 000- 350 000 μm^2 (siehe Abbildung 3.10).

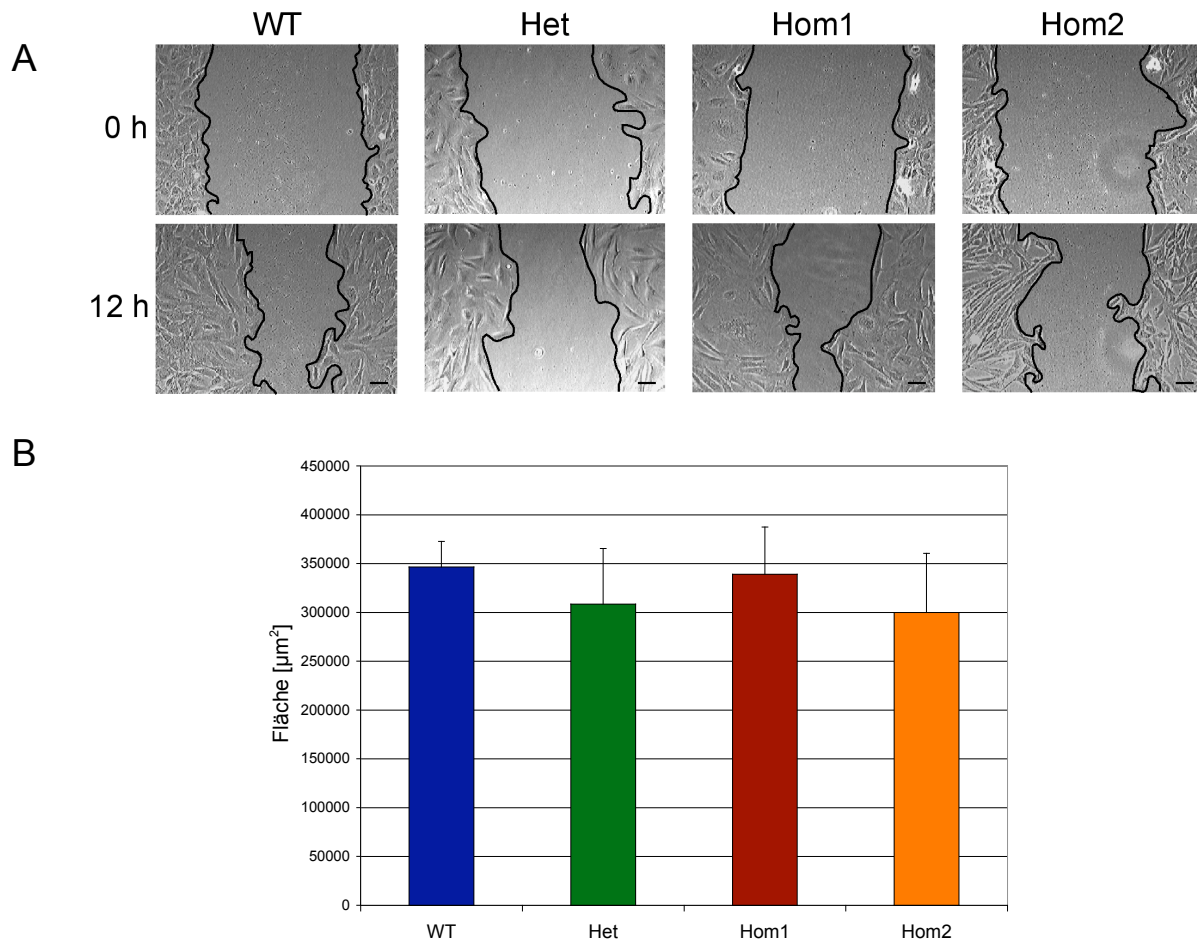


Abbildung 3.10: Raver1-Wildtyp und Raver1-defizienten Zelllinien zeigen keine Unterschiede in der Zellmigration. In A sind exemplarisch für jeden Genotyp Wunden nach 0 h und 12 h im Phasenkontrast abgebildet. Es wurden Raver1-Wildtyp- (WT), heterozygote (Het) und homozygote (Hom1 und Hom2) Zelllinien analysiert. Die Balken entsprechen 20 μm . Die Differenz, die aus den Wundenflächen nach 0 h und 12 h ermittelt wurde, stellt den in die Wunde eingewachsenen Bereich dar und ist in μm^2 in B aufgeführt. Die eingewachsene Fläche wurde in zwei unabhängigen Versuchen aus je drei Wunden ermittelt, die daraus resultierenden Mittelwerte sind mit Standardabweichung dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von Raver1 in kultivierten Fibroblasten keine signifikante Veränderung der Mirofilamentsystem-assoziierten Prozesse wie der Proliferation, Adhäsion und Migration verursacht. Somit scheint Raver1 in diesen Prozessen keine essenziellen Funktionen zu übernehmen oder die Zellen können den Verlust von Raver1 (z. B. durch redundante Proteine) kompensieren.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung von Raver2

Die funktionelle Redundanz zweier Proteine ist eine Möglichkeit, wie eine Zelle oder ein Organismus den Ausfall eines Genproduktes kompensieren kann. Auch für Raver1 wäre ein solches Szenario denkbar. Anhand von Datenbank-Analysen sollte deshalb ermittelt werden, ob ein mögliches Raver1 homologes Protein existiert. Hierbei wurde die RRM-Region von Raver1 als Köder benutzt, und in einer Datenbank ein muriner cDNA-Klon (A430091002Rik, Accession No. NM_183024) mit einem offenen Leseraster identifiziert, der für ein bisher unbekanntes Protein mit 625 Aminosäuren (72 kDa) kodiert. Durch vergleichende Analysen mit Raver1 sollte überprüft werden, ob es sich bei dem neu identifizierten Protein tatsächlich um ein Raver1-verwandtes Protein handelt.

3.2.1 Vergleichende Darstellung von Raver1 und Raver2

Computergestützte Sequenzanalysen zeigten auch in dem identifizierten cDNA-Klon drei RRM, die wie bei Raver1 im N-Terminus liegen und eine hohe Homologie zu Raver1 aufweisen (siehe Abbildung 3.11). Zur Analyse der Homologie der RRM wurde ein Aminosäure-Sequenzvergleich der konservierten RNP-Motive von Raver1 und dem neu identifizierten Klon im Bezug auf das Konsensus-Motiv der hnRNP-Familie durchgeführt. Dieses Konsensus-Motiv wurde aus dem Vergleich vieler RNP-Motive von unterschiedlichen Proteinen ermittelt und zeichnet sich dadurch aus, dass das RNP-2 Motiv aus einer Abfolge von einer aliphatischen, einer aromatischen, einer aliphatischen, zwei beliebigen Aminosäuren und einem Leucin besteht. Das Oktapeptid des RNP-1 Motivs besteht hingegen aus einer Abfolge von einer basischen Aminosäure, einem Glycin, einer aromatischen, einer kleinen, einer aromatischen, einer aliphatischen, einer beliebigen und einer aromatischen Aminosäure (Shamoo et al., 1995, Siomi und Dreyfuss, 1997, Kielkopf et al., 2004). Die RNP-Motive von Raver1 und dem neu identifizierten Klon weisen da, wo sie sich vom Konsensus-Motiv der hnRNP-Familie geringfügig unterscheiden, eine gemeinsame, zumeist identische Abweichung auf. Aufgrund dieser Homologie wurde der neu identifizierte Klon Raver2 genannt. Neben den RRM scheint die Anordnung der Signalsequenzen von Raver1 und Raver2 ebenfalls ähnlich zu sein. So konnten anhand von computergestützten Analysen ebenfalls zwei NLS-Motive identifiziert werden, wobei das eine N-terminal der RRM (Aminosäuren 1-10), das andere im extremen C-Terminus (Aminosäuren 619-622; Konsensus-Motiv KKKR) liegt. Außerdem konnte ebenfalls

eine leucinreiche zentrale Region (Aminosäuren 311-370) identifiziert werden, für die bei Raver1 eine mögliche Exportfunktion postuliert wurde (siehe Abbildung 3.11).

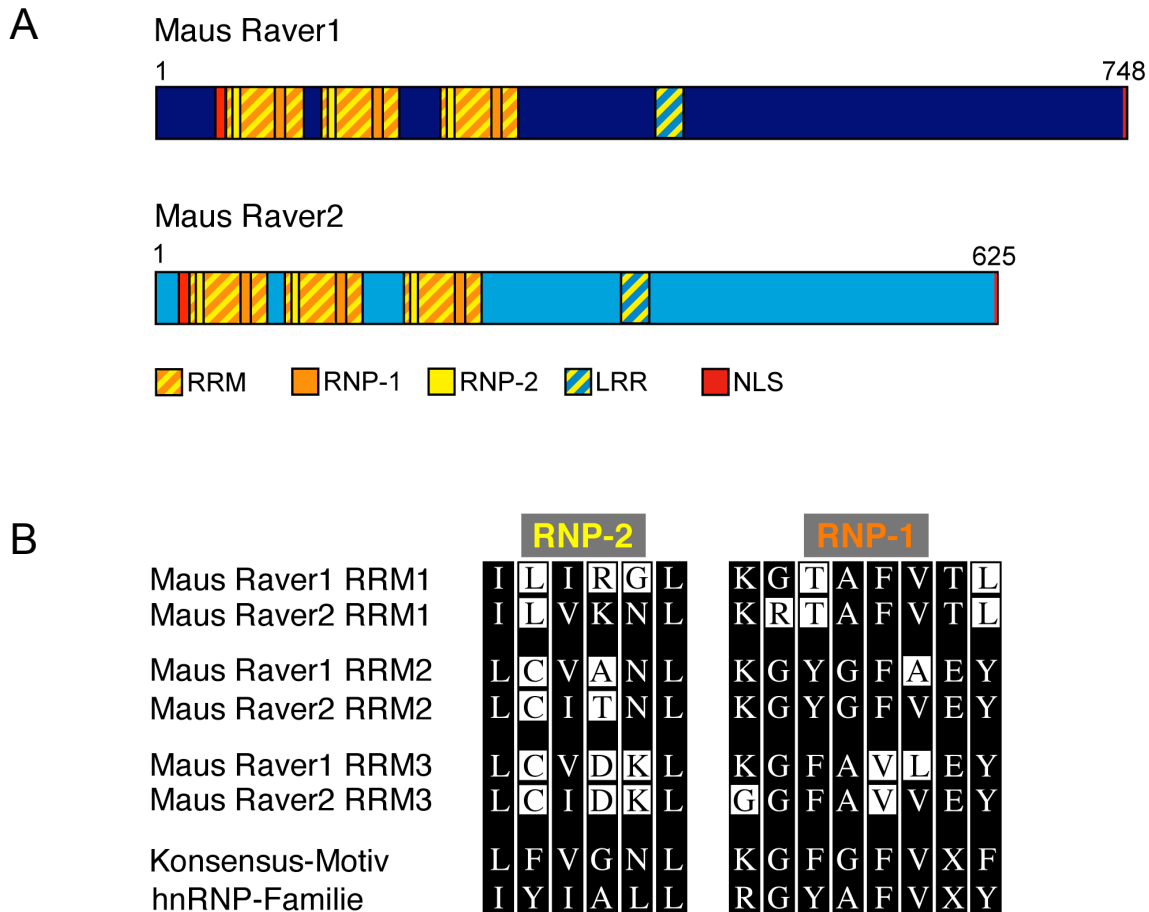


Abbildung 3.11: Vergleichende schematische Darstellung von Raver1 und Raver2. (A) Domänen der Primärsequenz von Raver1 (dunkelblau) und Raver2 (hellblau). Die RRM-s sind gelb-orange gestreift, mit den konservierten Motiven RNP-2 (gelb) und RNP-1 (orange), abgebildet. Die N- und C-terminale NLS ist rot eingezeichnet und die zentrale leucinreiche Region (LRR) blau-gelb gestreift markiert. (B) Sequenzvergleich der RNP-Motive, RNP-2 und RNP-1 von Raver1 und Raver2, im Vergleich zum Konsensus-Motiv der hnRNP-Familie. Die vom Konsensus-Motiv abweichenden Aminosäuren sind mit weißen Kästchen hervorgehoben. Raver1 und Raver2 weisen identische oder ähnliche Aminosäure-Substitutionen auf.

Außerhalb der konservierten Bereiche unterscheiden sich die beiden Raver-Proteine in ihrer Sequenz voneinander und zeigen eine Homologie von 45%. Jedoch ist die Anordnung der drei RRM-s im N-terminalen Bereich im Vergleich zu anderen traditionellen hnRNPs einzigartig. Anhand von Datenbank-Analysen konnten ähnliche Proteine wie die Hu-Proteine identifiziert werden. Sie beinhalten ebenfalls drei RRM-s, wobei die ersten beiden RRM-s im N-Terminus der Proteine gruppiert sind und die dritte RRM durch eine ausgedehnte „Linker“-Region von den ersten beiden getrennt ist. Bei Raver1 und Raver2 ist diese „Linker“-Region nicht vorhanden. Im Domänenvergleich, weisen die Raver-Proteine ebenfalls Ähnlichkeiten zu ROD und dem

Raver1-Liganden PTB auf. Diese Proteine zeichnen sich allerdings durch vier RRM-s aus, die zu je zwei Tandems organisiert sind (siehe Abbildung 3.12).



Abbildung 3.12: Raver1 und Raver2 besitzen einen einzigartigen Domänenaufbau. Datenbank-Analysen der Raver2- und Raver1-cDNA mit RRM-beinhaltenen Proteinen. Die RRM-s von Raver1 und Raver2 sind vergleichend mit den RRM-s der Hu-Proteine, ROD („regulator of differentiation“) und PTB dargestellt. Die RRM-s von Raver1 und Raver2 weisen eine einmalige Organisation innerhalb der RRM-beinhaltenen Proteine auf. Die Ziffern bezeichnen die Aminosäuresequenzen.

In weiteren Datenbank-Analysen konnte auch für das Raver2-Protein eine Expression nur in Vertebraten nachgewiesen werden. Das in Abbildung 3.13 abgebildete Dendrogramm basiert auf Raver2 „expressed sequence tags“ (EST) verschiedener Vertebraten. Die Sequenzhomologie zum Raver2-Protein aus der Maus reichen von 94,8% Aminosäureübereinstimmung vom Raver2-Protein aus der Ratte bis hin zu 64,0% Aminosäureübereinstimmung in *Xenopus laevis* (Kleinhenz et al., 2005). In Bezug auf die ausschließliche Expression der Raver-Proteine in Vertebraten unterscheiden sie sich beispielsweise auch von anderen Mitgliedern der traditionellen hnRNPs wie PTB und hnRNP K (Robida und Singh, 2003, Bomsztyk et al., 2004). Aufgrund der Sequenzanalyse und der einzigartigen Anordnung der drei am N-Terminus gruppierten RRM-s von Raver1 und Raver2 sowie die auf Vertebraten beschränkte Expression, kann Raver2 als ein Raver1-verwandtes Protein betrachtet und beide Proteine in eine neue Unterfamilie der hnRNPs eingruppiert werden.

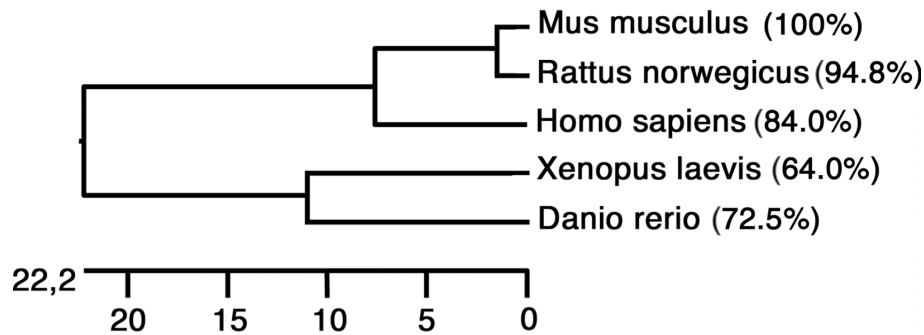


Abbildung 3.13: Phylogenetischer Stammbaum von Raver2. Der phylogenetische Stammbaum von Maus-Raver2 (*Mus musculus*), *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* und *Danio rerio* zeigt die Sequenzunterschiede von Raver2 in verschiedenen Organismen. Die Armlänge der X-Achse gibt den prozentualen Anteil an Sequenzunterschiede wieder.

3.2.2 Charakterisierung des monoklonalen Raver2-Antikörpers 4C8

Zur Herstellung Raver2-spezifischer monoklonaler Antikörper wurden für die Immunisierung von Mäusen zwei kurze, synthetisch hergestellte Peptide verwendet. Die Sequenz der Peptide wurde mit Hilfe von Datenbank-Analysen so gewählt, dass sie in einem Bereich des Raver2-Proteins liegen, der keine Homologie zu Raver1 und anderen Proteinen aufweist. Die Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide befindet sich im C-terminalen Bereich des Raver2-Proteins und ist für Peptid 1 LRNEKRGSSYLIS und für Peptid 2 NQKTPQSQPKGTE. Die Immunisierung der Mäuse, Fusion der Lymphocyten mit Myelomzellen und Selektion der Hybridomazellen wurde freundlicherweise von Sabine Buchmeier durchgeführt. Die generierten Klone wurden zunächst im ELISA gegen das als Immunogen verwendete Peptid getestet und Zellkulturüberstände der so ermittelten positiven Klone wurden für weitere Analysen eingesetzt. Dazu wurde zunächst das offene Leseraster (ORF) von Raver2 über RT-PCR aus adulten Mausgehirn kloniert und in eukaryontische Expressionsvektoren inseriert (siehe Kapitel 2.1.6). Darüber hinaus wurden für weitere Untersuchungen auch Deletionsfragmente von Raver2 hergestellt (siehe Abbildung 3.14), bei denen sukzessive vom N-Terminus her die RRM's deletiert wurden. Daraus resultierten die Konstrukte Raver2- Δ RRM1, Raver2- Δ RRM12 und Raver2- Δ RRM123. Die Deletionskonstrukte wurden in den pcDNA3-Vektor (Invitrogen) kloniert und mit einem N-terminalen BiPro-,tag“ versehen, so dass das entstehende Fusionsprotein einen N-terminalen BiPro-Fusionsanteil trägt. Die Proteine können in diesem Fall über den BiPro-Antikörper (4A6) nachgewiesen werden (Wiedemann et al., 1996, Rüdiger et al., 1997,).

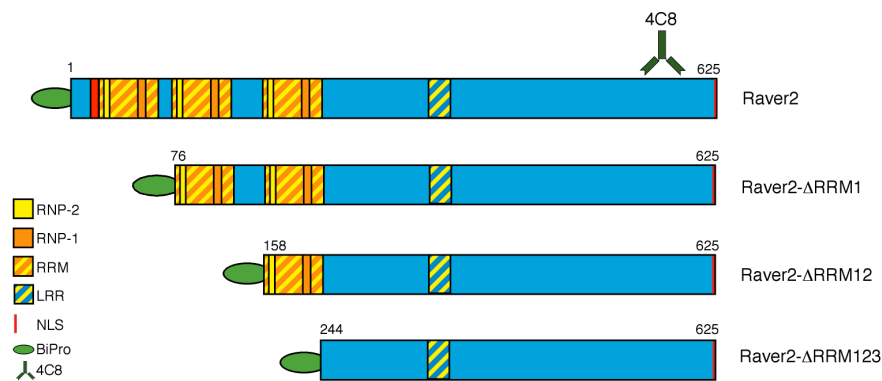


Abbildung 3.14: Darstellung der Raver2-Deletionskonstrukte. Bei den Raver2-Deletionskonstrukten wurde jeweils eine weitere RRM entfernt. Die RRM-s sind in orange gestreift, mit den konservierten Motiven RNP-2 (gelb) und RNP-1 (orange) dargestellt. Die N- und C-terminale NLS ist rot und die leucinreiche Region (LRR) blau-gelb gestreift abgebildet. Am N-Terminus ist in grün der BiPro-„tag“ symbolisiert. Der Bindungsbereich des 4C8-Antikörpers ist eingezeichnet. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen wieder.

HeLa-Zellen wurden mit BiPro-Raver2-Konstrukten transfiziert und dann die Zellkulturüberstände im „Western Blot“ getestet. Es zeigte sich, dass nur ein Klon (4C8) eine positive Reaktion zeigte (siehe Abbildung 3.15). Da das Peptid, gegen das der Antikörper generiert wurde, im C-terminalen Bereich des Raver2-Proteins liegt, wurden wie erwartet nicht nur das Wildtyp-Protein, sondern auch alle verwendeten Deletionskonstrukte vom 4C8-Antikörper erkannt.

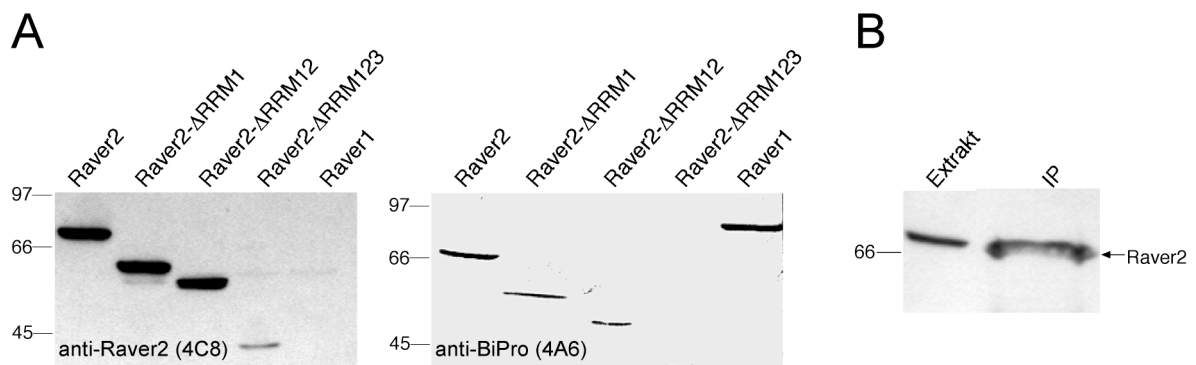


Abbildung 3.15: Charakterisierung des Raver2-Antikörpers 4C8. (A) „Western Blot“-Analysen. Raver2, Raver2-Deletionskonstrukte sowie Raver1 mit jeweils N-terminalen BiPro-„tag“ wurden in HeLa-Zellen transfiziert und exprimiert, Zellextrakte wurden nach SDS-PAGE mit dem Raver2-spezifischen Antikörper 4C8 analysiert (A, links). Rechts ist der Blot mit dem BiPro-Antikörper dargestellt. Der 4C8 erkennt alle Raver2-Konstrukte, nicht aber Raver1. (B) Immunpräzipitation von exogenem Raver2 mit dem 4C8-Antikörper. In HeLa-Zellen transfizierter Raver2 wurde mit dem 4C8-Antikörper präzipitiert und im „Western Blot“ analysiert. Links ist ein Aliquot des Ausgangsextraktes aufgetragen, rechts ein Aliquot der Immunpräzipitation (IP). Raver2 wird mit dem 4C8-Antikörper präzipitiert

Mögliche Kreuzreaktionen mit Raver1 wurden mit BiPro-Raver1-pcDNA3 transfizierten HeLa-Zellen untersucht (siehe Abbildung 3.15). Der 4C8-Antikörper zeigt im „Western Blot“ keine Kreuzreaktion mit Raver1. Wie erwartet werden alle aufgetragenen Proteine durch den BiPro-Antikörper erkannt.

Die Reaktivität des 4C8-Antikörpers mit nicht denaturiertem Protein wurde mittels Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz analysiert. Das BiPro-Raver2-pcDNA3-Konstrukt wurde in HeLa-Zellen transfiziert und eine Immunpräzipitation mit dem 4C8-Antikörper durchgeführt. In Abbildung 3.15 B ist zu sehen, dass der 4C8-Antikörper nicht nur spezifisch das 72 kDa Raver2-Protein erkennt, sondern auch dieses präzipitieren kann.

Für die Immunfluoreszenz wurden HeLa-Zellen mit einem EGFP-Raver2-Konstrukt transfiziert, das für ein rekombinantes Fusionsprotein aus einem N-terminalen EGFP („enhanced green fluorescent protein“-Fusionsanteil (Clontech) und Raver2 kodiert. Dies ermöglicht den direkten fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Raver2 über EGFP und den Vergleich mit der 4C8 Reaktivität in der Immunfluoreszenz (siehe Abbildung 3.16)

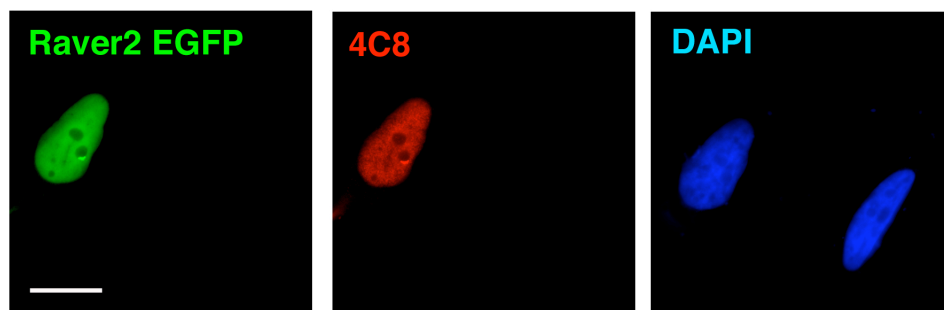


Abbildung 3.16: Kernlokalisierung von transfiziertem Raver2 in HeLa-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EGFP-Raver2 transfizierten HeLa-Zellen. Das EGFP-Raver2-Fusionsprotein (links) wurde mit dem 4C8-Antikörper und einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (Mitte), der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt (rechts). Der Balken entspricht 10 μ m. Der 4C8-Antikörper weist das EGFP-Raver2-Konstrukt ausschließlich im Zellkern nach.

EGFP-Raver2 lokalisiert im Zellkern diffus im Nukleoplasma, unter Aussparung der Nukleoli. Ein identisches Bild ergab sich bei der Anfärbung mit dem 4C8-Antikörper. Nicht-transfizierte HeLa-Zellen gaben kein Signal. Dies könnte bedeuten, dass der Antikörper humanen Raver2 nicht erkennt oder dass Raver2 in HeLa-Zellen nicht exprimiert wird.

3.2.3 Expression und subzelluläre Lokalisation von endogenem Raver2

In ersten „Northern Blot“-Analysen (durchgeführt von M. Fabienke, AG Arnold), wurden Raver2-Transkripte in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Mausembryos von Embryonaltag E 8,5 bis E 14,5 nachgewiesen (siehe Abbildung 3.17 A).

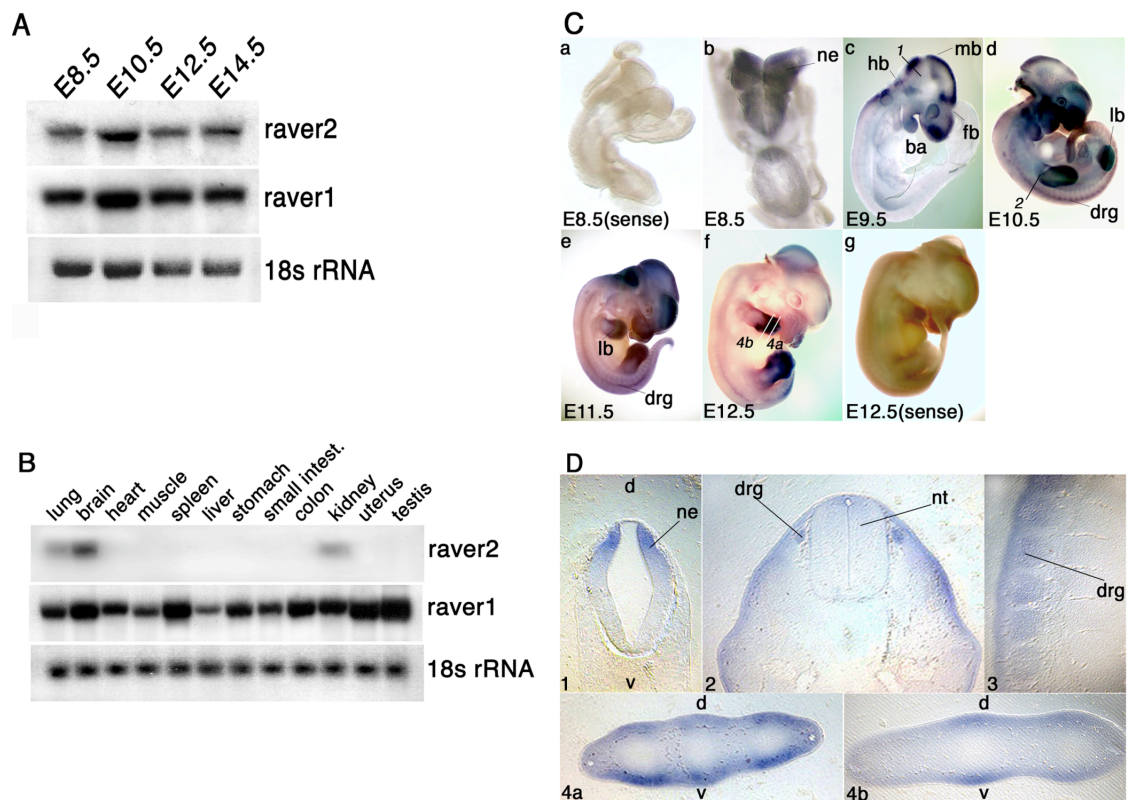


Abbildung 3.17: Raver2 Expressionsmuster während der Mausembryogenese und in adultem Gewebe. „Northern Blot“-Analysen von embryonaler RNA E 8,5-E 14,5 (A) und verschiedenen adulten Geweben (B). Die Hybridisierung erfolgte mit spezifischen Sonden für Raver2, Raver1, und 18s rRNA als Ladungskontrolle. (C) „Whole mount“ *in situ* Hybridisierungen von Mausembryonen E 8,5-12,5 mit einer Raver2-spezifischen Sonde („antisense“ RNA, b-f) und „sense“ RNA als Kontrolle (a, g). (D) Transversale (1, 2, 4a) und sagittale (3) Schnitte der in C abgebildeten „whole mount“ Embryonen. Eine regionale Verteilung der Raver2-Transkripte ist erkennbar. ba: Branchialbogen, d: dorsal, drg: Spinalganglion, fb: Vorderhirn, hb: Hinterhirn, lb: Extremitätenanlage, mb: Mittelhirn, ne: Neuroepithelium, nt: Neuralrohr, v: ventral. Abbildung entnommen aus Kleinhenz et al., 2005, Daten von M. Fabienke.

In „Northern Blot“-Analysen adulter Mausgewebe konnte gezeigt werden, dass Raver2 im Gegensatz zu Raver1, der ubiquitär exprimiert ist, gewebespezifisch exprimiert wird. Raver2-Transkripte konnten ausschließlich im Gehirn, in der Lunge und der Niere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.17 B). Eine genaue Expressions-Analyse von Raver2 im Mausembryo erfolgte in „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen und ist in Abbildung 3.17 C und D

dargestellt. Während der Embryogenese ist Raver2 zunächst im Neuroepithelium (E 8,5) und während der weiteren Entwicklung (E 9,5-E 12,5) in den dorsalen Regionen von Vorder-, Mittel- und Hinterhirn, sowie in Spinalganglien, Kiemenbögen und den sich entwickelnden Extremitätenanlagen exprimiert (Kleinhenz et al., 2005).

Mit dem Raver2-Antikörper 4C8 konnte auch Raver2-Protein im Mausembryo nachgewiesen werden. Dazu wurden Proteinextrakte aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien hergestellt und im „Western Blot“ im Vergleich zu Raver1 getestet (Abbildung 3.18). Beide Raver-Proteine sind in allen drei untersuchten Embryonalstadien exprimiert.

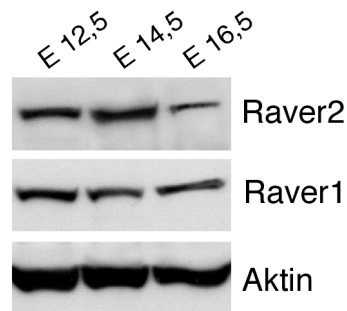


Abbildung 3.18: Raver2 ist in Mausembryonen exprimiert. Aus Embryonen des Embryonalaltages E 12,5-E 16,5 wurden Proteinextrakte hergestellt und auf die Expression von Raver2 mit dem Antikörper 4C8 und Raver1 mit dem monoklonalen Antikörper 5G6 im „Western Blot“ untersucht. Aktin wurde als Ladungskontrolle mit dem polyklonalen Aktin-Antikörper nachgewiesen.

Aufgrund des distinkten zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters von Raver2 in Mausembryonen sollte untersucht werden, ob Raver2 ebenfalls in Zelllinien mit neuronalem bzw. muskulärem Charakter exprimiert wird. In Anlehnung an die für Raver1 beobachtete Translokation während der Differenzierung von Skelettmuskeln wurde außerdem untersucht, ob Raver2 sowohl in proliferierenden als auch in sich differenzierenden Zellen exprimiert wird.

Als Zelllinien wurden zum einen ES-Zellen sowie die murine Myoblastenzelllinie C2C12 verwendet und zum anderen wurden Zelllinien mit neuronalem Charakter, wie die murine Neuroblastoma-Zelllinien NSC-19 und N2a sowie die Ratten-*Phaeochromocytoma* Zelllinie (PC-12) auf eine mögliche Raver2-Expression hin untersucht. In C2C12-Zellen wurde durch Pferdeserum die Fusion der Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben eingeleitet, während N2a, NSC-19 und ES-Zellen durch Retinsäure oder NGF- β zur Differenzierung gebracht wurden (siehe Kapitel 2.4.3). In Abbildung 3.19 A sind die Zellen jeweils im proliferierenden und im differenzierten Stadium kurz vor der Zellernte gezeigt. Deutlich sind die Myotuben der C2C12-Zellen (Abbildung 3.19 A d) und die Neuritenbildung bei den neuronalen- (Abbildung 3.19 A f und A h) und ES-Zellen (Abbildung 3.19 A b) zu erkennen. Abbildung 3.19 B zeigt die korrespondierenden „Western Blots“ für endogenen Raver2, Raver1, Aktin oder Vinculin.

Raver1 wurde wie erwartet in allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Eine Expression von Raver2 ließ sich nur in den ES-Zellen unabhängig vom Differenzierungsgrad feststellen, nicht aber in den untersuchten proliferierenden oder differenzierenden Zelllinien C2C12, NSC19 und N2a, sowie in den proliferierenden PC-12-Zellen.

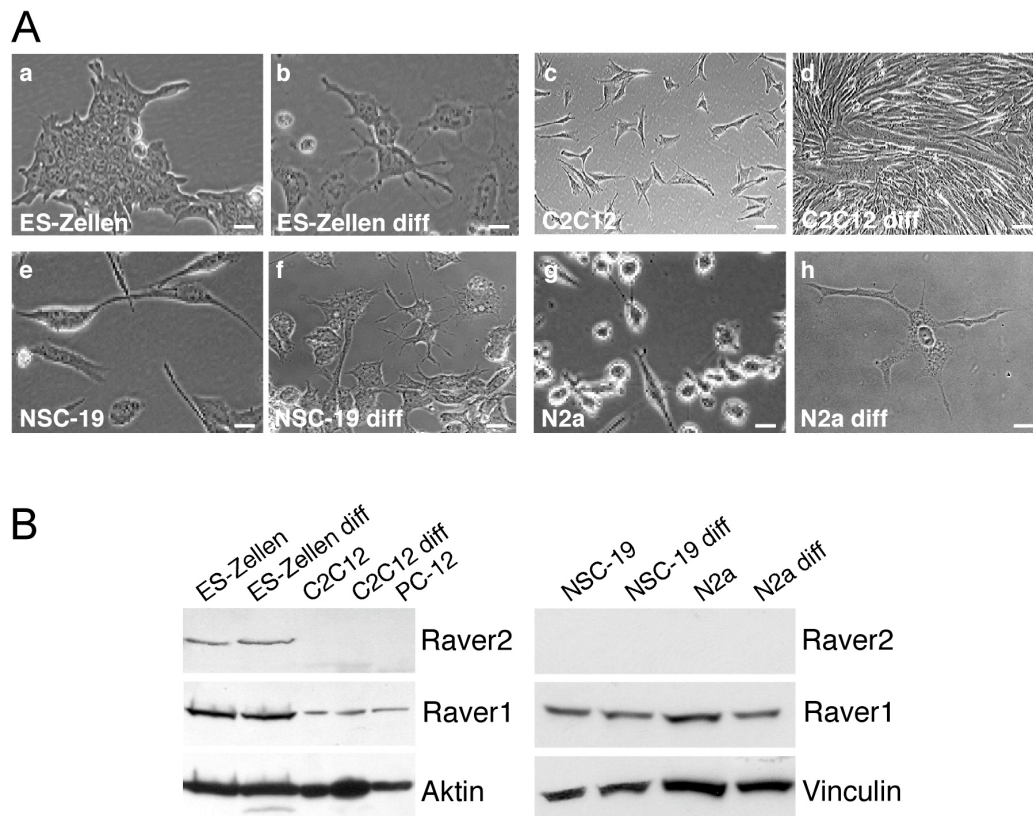


Abbildung 3.19: Nachweis von endogenen Raver2 in unterschiedlichen Zelllinien. (A) Die Morphologie der verwendeten Zellen kurz vor der Zellernte in Phasenkontrastaufnahmen. ES-, C2C12-, NSC-12- und N2a-Zellen sind jeweils im proliferierenden (a, c, e, und g) sowie im differenzierten (b, d, f und h) Stadium dargestellt. Die Balken entsprechen 20 µm. (B) In „Western Blot“-Analysen von ES-, C2C12-, NSC-19- und N2a-Zellen wurden im proliferierenden und differenzierenden (diff) Stadium, sowie in PC-12 Zellen, die Expression von Raver2 durch den 4C8-Antikörper und Raver1 durch den 5G6-Antikörper nachgewiesen. Vinculin und Aktin wurden als Ladungskontrollen mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der ubiquitär exprimierte Raver1 ist in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar; Raver2 wird hingegen nur in ES-Zellen exprimiert.

Diese Daten unterstreichen das in den „whole mounts“ *in situ* Hybridisierungen und „Northern Blot“-Analysen gefundene restriktive Expressionsmuster von Raver2. Erstaunlicherweise konnte in neuronalen Zelllinien keine Expression von Raver2 nachgewiesen werden, obwohl Raver2 in neuronalen Gewebe exprimiert ist (siehe Abbildung 3.17). Möglicherweise stellen neuronale Zellen die Synthese von Raver2 ein, eine Neuritenbildung scheint jedenfalls in Abwesenheit von Raver2 möglich zu sein.

Da keine Expression von Raver2 in neuronalen Zelllinien nachweisbar war wurden primäre, hippocampale Neuronen und Gliazellen aus Rattenembryonen (E 16,5) isoliert. Die Isolation und Kultivierung der Neuronen wurde freundlicherweise von Dr. Nina Wittenmayer (AG Joachim Kirsch, Heidelberg) durchgeführt.

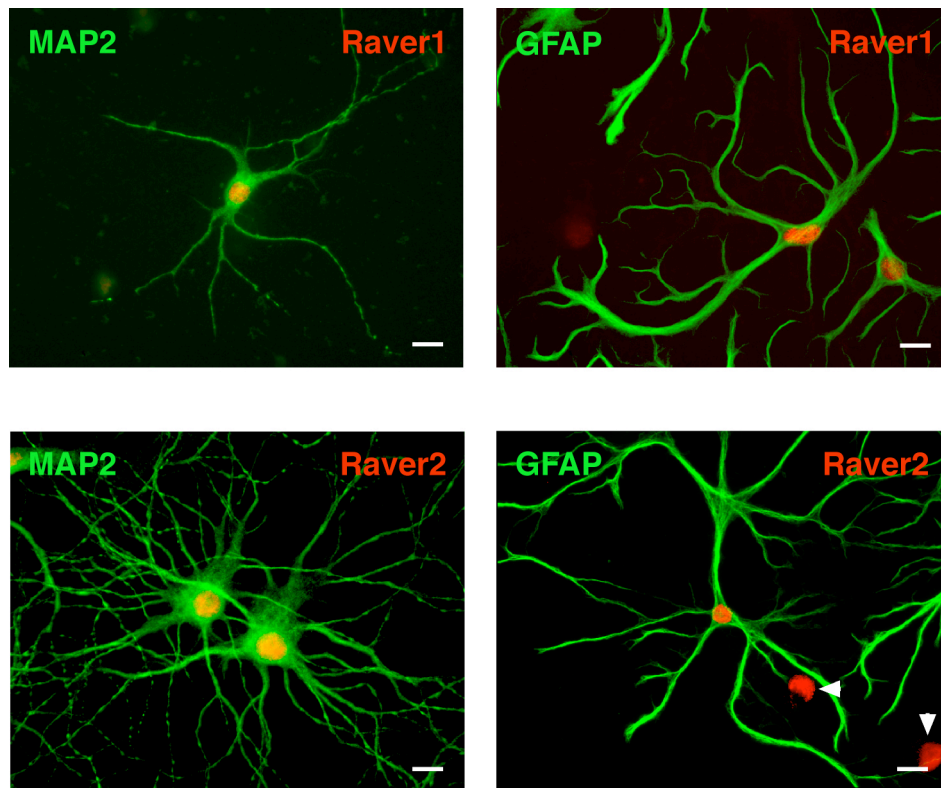


Abbildung 3.20: Raver2 und Raver1 lokalisieren im Zellkern primärer Ratten-Neuronen. Doppelimmunfluoreszenzen von primären, hippocampalen Neuronen (links) und Gliazellen (rechts) der Ratte. Die Raver-Proteine wurden mit den monoklonalen Antikörpern 5G6 (Raver1) und 4C8 (Raver2) nachgewiesen (rot). Neuronen wurden durch Gegenfärbung mit einem polyklonalen MAP2-Antikörper identifiziert. Die Gliazellen wurden spezifisch durch den Nachweis von GFAP dargestellt (beide in grün). Beide Raver-Proteine sind in beiden Zelltypen exprimiert und im Zellkern lokalisiert. Pfeile zeigen Raver2 in Zellkernen von Neuronen, die durch den GFAP-Antikörper nicht erkannt werden. Balken entsprechen 10 μ m.

Die Expression von Raver1 und Raver2 wurde vergleichend in den primären, hippocampalen Ratten-Neuronen und -Gliazellen untersucht, wobei die beiden Zelltypen durch spezifische Markerproteine identifiziert wurden. Neuronen wurden mit einem Antikörper gegen das dendritische Protein MAP2 und Gliazellen über eine Färbung mit Antikörpern gegen das „Glial Fibrillary Acid Protein“ (GFAP) identifiziert. Die Detektion von Raver1 und Raver2 erfolgte über die spezifischen Antikörper (5G6 und 4C8). Eine Übereinanderlagerung der Doppelimmunfluoreszenzen für MAP2 oder GFAP und Raver1 oder Raver2 ist in Abbildung 3.20

dargestellt. Raver1 und Raver2 sind sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen exprimiert und dort im Zellkern lokalisiert.

Eine überwiegende Kernlokalisation von Raver2 in Immunfluoreszenzen muss jedoch nicht bedeuten, dass Raver2 ausschließlich im Zellkern vorkommt. Für viele Mitglieder der hnRNP-Familie, darunter Raver1 und PTB, wurde beschrieben, dass sie die Fähigkeit besitzen, zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln (Hüttelmaier et al., 2001, Kamath et al., 2001, Dreyfuss et al., 2002). Für den Export von PTB ist die RRM2 und eine N-terminale Sequenz wichtig (Li und Yen 2002). Der Export von Raver1 kann auch RRM-unabhängig erfolgen (Diplomarbeit F. Falley, 2004). Der zu Raver1 ähnliche Domänenaufbau von Raver2 mit zwei NLS und einer zentralen leucinreichen Region, die eine NES beinhalten könnte, ließ vermuten, dass auch Raver2 in der Lage sein könnte, zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln.

Um diese Möglichkeit zu testen und weiterhin zu untersuchen, ob die RRM2 oder der N-terminale Bereich von Raver2 für den Export benötigt werden, wurden Heterokaryon-Analysen durchgeführt (Michael et al., 1995, Fan und Steitz, 1998). Raver2-Wildtyp und die Raver2-Deletionskonstrukte wurden als EGFP-Proteine in HeLa-Zellen exprimiert. Diese wurden mit murinen C2C12 Myoblasten in Gegenwart von Cycloheximid fusioniert, um die *de novo* Proteinbiosynthese zu unterbinden. Das nicht pendelnde Protein hnRNP C2 diente als Negativkontrolle (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1992, Nakielnny und Dreyfuss, 1996). Vier Stunden nach der Zellfusion erfolgte die Fixierung der Zellen und eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Versuches. Die DAPI-Färbung ermöglicht es, zwischen humanen HeLa- und murinen C2C12-Zellkernen zu unterscheiden, da die Nukleolus-Muster der beiden Zelltypen sehr unterschiedlich sind.

In Abbildung 3.21 ist gezeigt, dass Raver2-Wildtyp und alle verwendeten Raver2-Deletionskonstrukte die Fähigkeit besitzen, im „Heterokaryon Assay“ zu pendeln. Die EGFP-Raver2-Fusionsproteine sind sowohl in den transient transfizierten HeLa-Zellkernen als auch in den fusionierten C2C12-Zellkernen nachweisbar. Das EGFP-hnRNP C2-Fusionsprotein verbleibt hingegen nur im HeLa-Zellkern. Da alle eingesetzten EGFP-Raver2-Fusionsproteine im „Heterokaryon Assay“ zwischen den Zellkernen pendeln können, ist der gesamte N-terminale Bereich von Raver2 einschließlich der RRM2 offenbar nicht für die nukleocytoplasmatische Translokation erforderlich. Diese Beobachtungen stimmen mit denen für Raver1 überein und sind ein weiteres Indiz für eine funktionelle Verwandtschaft von Raver1 und Raver2.

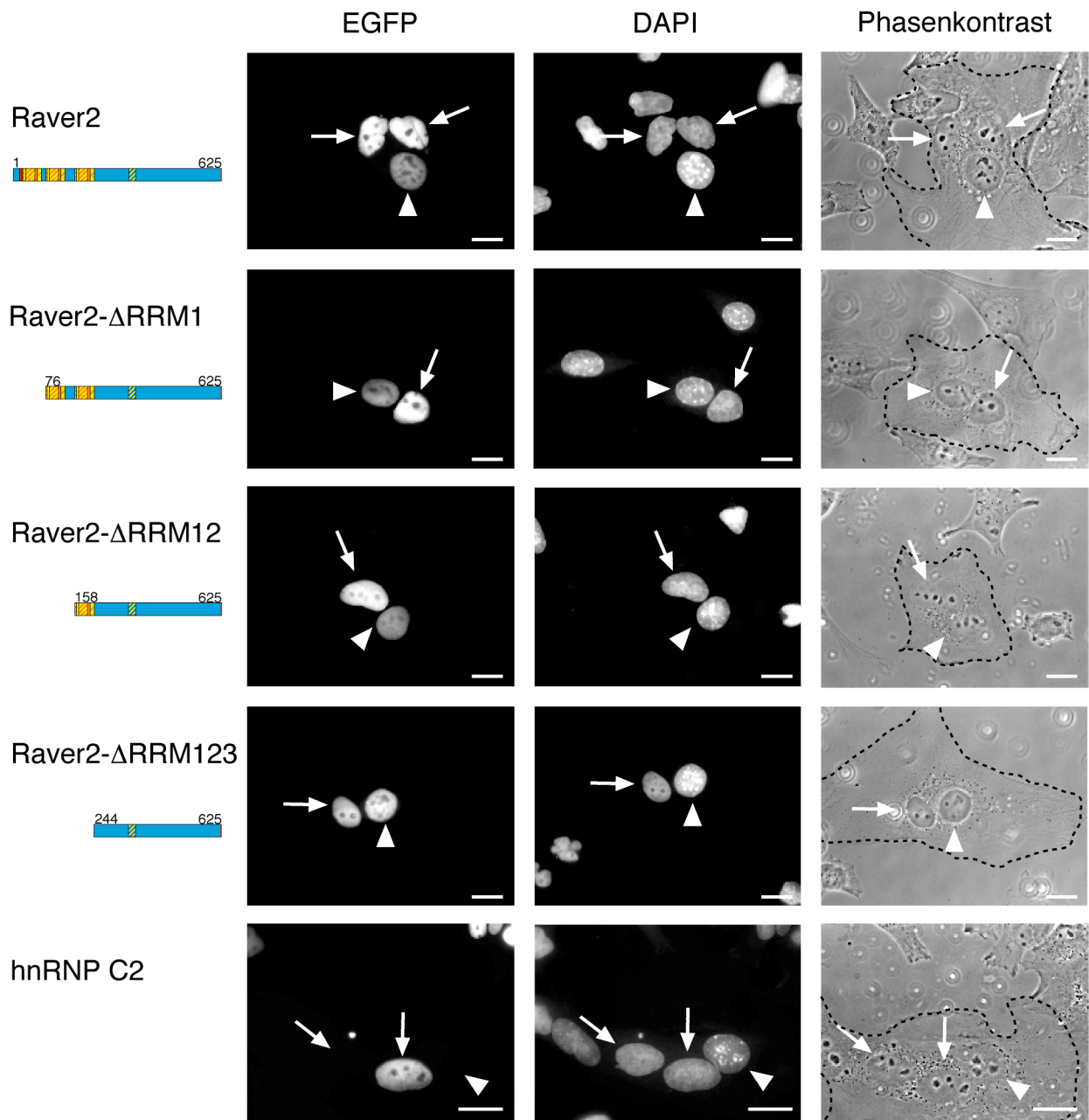


Abbildung 3.21: Nukleocytoplasmatische Translokation von Raver2 im „Heterokaryon Assay“. HeLa-Zellen wurden transient mit EGFP-Raver2 (obere Reihe) oder verschiedenen EGFP-Raver2-Deletionskonstrukten (mittlere Reihen) und EGFP-hnRNP C2 (untere Reihe) transfiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Cycloheximid mit murinen C2C12-Zellen fusioniert und nach 4 h wurde die EGFP-Fluoreszenz (linke Säule) analysiert. Die DAPI Färbung (mittlere Säule) erlaubt aufgrund des unterschiedlichen Nukleolus-Musters die Unterscheidung zwischen humanen (Pfeile) und Maus-Zellkernen (Pfeilspitzen). Rechts sind die Phasenkontrastaufnahmen der Heterokaryen dargestellt. Die Balken entsprechen 10 μm . Raver2 und die Raver2-Deletionskonstrukte können im „Heterokaryon Assay“ zwischen den Zellkernen pendeln, während hnRNP C2 ausschließlich im HeLa-Zellkern verbleibt.

3.2.4 Identifizierung von PTB als Bindungspartner von Raver2

Die bisher präsentierten Daten zeigen, dass Raver2 überwiegend während der Embryonalentwicklung exprimiert wird. Zur Identifizierung möglicher Bindungspartner von Raver2 wurde daher ein „Yeast Two-Hybrid Screen“ mit einer embryonalen (E 17,5) Maus-cDNA-Bank (Clontech) durchgeführt, bei dem Raver2 als Köder eingesetzt wurde, wobei Raver2 in den pGBKT7-Vektor kloniert und dadurch mit der DNA-Bindungsdomäne (DB) fusioniert wurde. Die cDNA-Bank lag im Vektor mit fusionierter Aktivierungsdomäne (AD) vor. Durch die „Yeast Two-Hybrid“-Interaktion kommt es zur Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4, was durch die Aktivität des LacZ-Gens nachgewiesen werden kann. In der Tabelle 3.01 sind die positiven Klone des „Yeast Two-Hybrid Screens“ aufgelistet. Viele dieser potenziellen Raver2-Liganden zeigten jedoch ebenfalls eine positive Reaktion mit dem Kontrollvektor, der eine Sequenz des Kernlamins C enthält (pGBKT7-lam, Clontech). Diese wurden daher als Falschpositive verworfen.

Tabelle 3.01: Ergebnis von „Yeast Two-Hybrid“-Analysen bei der Suche nach potenziellen Raver2-Liganden.

	Anzahl der Klone	Leseraster	Raver2	Lam
Snare-assoziiertes Protein SNAPIN	5	+	+	+
Filamin A	3	–	+	+
PTB1	2	+	+	–
EF1a	1	+	(+)	–
EF1G	1	+	(+)	–

Lam: pGBKT7-lam (Negativkontrolle, Clontech), +: Interaktion im „Yeast Two-Hybrid“, –: keine Interaktion im „Yeast Two-Hybrid“, (+): Interaktion konnte in Retransformationen nicht bestätigt werden

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden das Snare-assoziierte Protein SNAPIN und Filamin A als Falschpositive klassifiziert. Filamin A wies zudem ein falsches Leseraster auf. Die mit Raver2 als Köder gezogenen Elongationsfaktoren EF1 α und EF1G wurden in weiteren „Yeast Two-Hybrid“-Analysen untersucht. In diesen konnte die Interaktion jedoch nicht bestätigt werden, so dass auch diese potenziellen Bindungspartner als falschpositiv eingeschätzt wurden. PTB wurde

als potenzieller Ligand mit zwei Klonen im richtigen Leseraster identifiziert. Durch anschließende Sequenzierung konnten diese Klone als Isoform PTB1 identifiziert werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Klonen schien es sich bei PTB1 um einen echten Bindungspartner zu handeln und die Interaktion konnte in verschiedenen Retransformationsansätzen bestätigt werden (siehe Tabelle 3.02). Als Positivkontrolle für einen PTB1-Liganden diente Raver1, da dessen Interaktion mit PTB bereits auch biochemisch bestätigt werden konnte (Hüttelmaier et al., 2001). Raver1 und Raver2 interagieren im „Yeast Two-Hybrid“ nicht miteinander, ebenso konnten keine Raver1- oder Raver2-Homodimere gefunden werden.

Tabelle 3.02: Raver2 und Raver1 interagieren mit PTB1 im „Yeast Two-Hybrid“ System.

BD \ AD	Raver1	Raver2	PTB1	Vektor
Raver1	–	–	+	–
Raver2	–	–	+	–
PTB1	+	+	–	–
Vektor	–	–	–	–

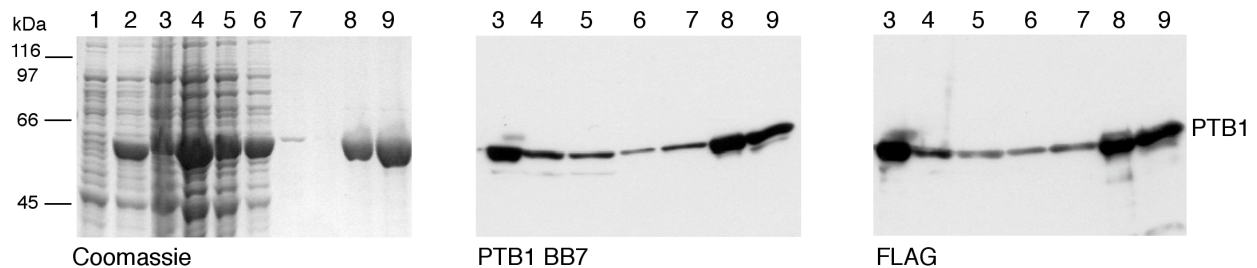
Horizontal sind die Konstrukte in dem pGBKT7 Vektor aufgelistet (BD). Vertikal sind die Konstrukte in dem pGADT7 Vektor aufgeführt (AD). Vektor steht für den entsprechenden Leervektor, der als Negativkontrolle diente. BD: DNA Bindungsdomäne, AD: Aktivierungsdomäne, +: Interaktion im „Yeast Two-Hybrid“, –: keine Interaktion im „Yeast Two-Hybrid“.

Für die biochemische Charakterisierung der Interaktion von Raver2 und PTB1 sollten beide Proteine rekombinant hergestellt werden. Beide Proteine wurden in *E. coli* (ER2566) mit N-terminalen His-„tag“ exprimiert. PTB1 trug zusätzlich einen FLAG-„tag“, Raver2 war mit einem weiteren BiPro-„tag“ versehen. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über die Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA) wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben.

Eine exemplarische Aufreinigung von FLAG-PTB1 und BiPro-Raver2 ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Das PTB1-Protein weist ein Molekulargewicht von 55 kDa auf und wurde im „Western Blot“ sowohl mit dem monoklonalen PTB-Antikörper BB7 und dem FLAG-Antikörper (M2, Sigma) als diskrete Bande nachgewiesen (Abbildung 3.22 A). Rekombinantes Raver2-Protein weist ein Molekulargewicht von 72 kDa auf. Im „Western Blot“ wurde mit dem Raver2-Antikörper 4C8, der im C-terminalen Bereich des Proteins bindet, ebenfalls nur eine Bande detektiert. Bei der Reaktion des Raver2-Proteins mit dem BiPro-Antikörper 4A6, der den

N-terminalen Fusionsanteil des Proteins erkennt, sind deutliche Degradationsbanden zu erkennen (Abbildung 3.22 B). Dies weist darauf hin, dass das Raver2-Protein vom C-terminalen Bereich her leicht degradiert wird.

A



B

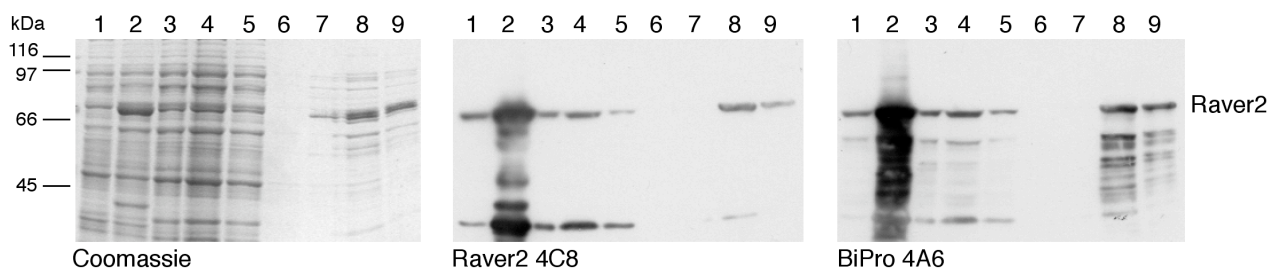


Abbildung 3.22: Darstellung der Proteinaufreinigung von Raver2 und PTB1. In Abbildung A ist eine PTB1-Proteinaufreinigung dargestellt, Links ist eine Coomassie-Brilliantblau-Färbung (Coomassie) der einzelnen Fraktionen nach SDS-PAGE, in der Mitte der „Western Blot“ mit dem PTB-Antikörper BB7 und rechts der „Western Blot“ mit dem FLAG-Antikörper abgebildet. (B) Analoge Aufreinigungsprofile von Raver2. Links ist die Coomassie-Brilliantblau-Färbung, in der Mitte der „Western Blot“ mit dem Raver2-Antikörper 4C8 und rechts der „Western Blot“ mit dem BiPro-Antikörper 4A6 dargestellt. Die Zahlen stehen für folgende Proben: (1) Bakteriensuspension vor Induktion, (2) Bakteriensuspension nach Induktion, (3) Überstand des Bakterienextraktes nach Zentrifugation, (4) Überstand des Bakterienextraktes nach Inkubation mit der Ni-NTA, (5) Waschfraktion Lysispuffer, (6) Waschfraktion Waschpuffer, (7) Waschfraktion Elutionspuffer, (8) Protein-Elutionsfraktion, (9) Aufgereinigtes Protein.

3.2.4.1 Nachweis einer direkten Interaktion *in vitro*

Die direkte Interaktion von Raver2 und PTB1 wurde zunächst in Protein-Protein-„Dotblots“ („Far Western“) analysiert. Als Positivkontrolle diente wieder Raver1. Das in den folgenden Versuchen verwendete rekombinante FLAG-Raver1-Fusionsprotein wurde freundlicherweise von Dr. A. Zieseniß zur Verfügung gestellt. Im „Far Western“ (siehe 2.3.9) wurden Raver2, Raver1 und PTB1 auf eine direkte Interaktion miteinander getestet. Als Negativkontrolle

fungierte immobilisiertes BSA. Die Qualität der verwendeten Proteine wurde zunächst in einem SDS-Gel überprüft (siehe Abbildung 3.23 A). Zunächst wurde auf die Bindung von PTB1 an immobilisierte Raver-Proteine getestet. Sowohl mit Raver1 als auch mit Raver2, nicht aber mit BSA fand eine Interaktion statt (Abbildung 3.23 B links). Wurden Raver2 und PTB1 immobilisiert und mit Raver1 überschichtet, konnte nur die Bindung von Raver1 an PTB1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.23 B Mitte). Auch bei einer Analyse der Bindung von Raver2 an immobilisiertes PTB1 und Raver1 konnte nur die Interaktion mit PTB1 bestätigt werden (Abbildung 3.23 B rechts). Diese Analysen zeigen, dass Raver1 und Raver2 zwar beide mit PTB1, nicht aber direkt miteinander interagieren.

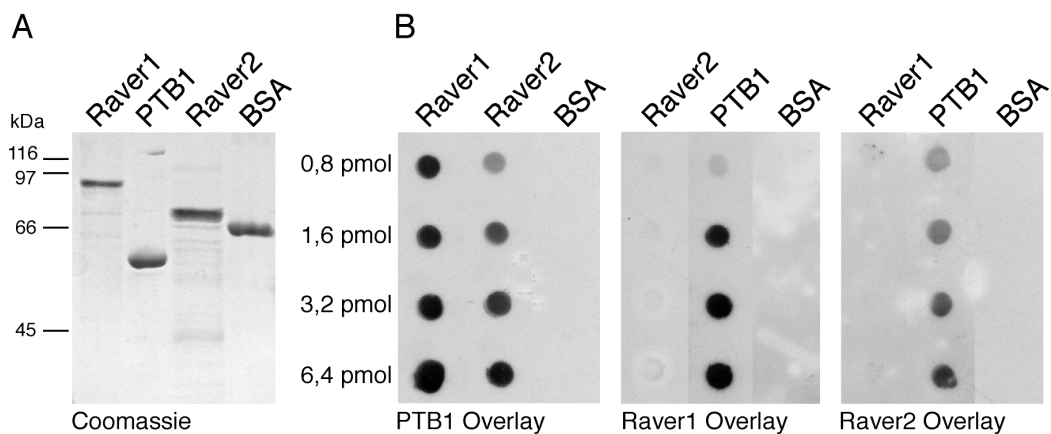


Abbildung 3.23: Raver2 und Raver1 interagieren mit PTB1 im „Far Western“. (A) In dem Coomassie-Brilliantblau-gefärbten Gel (Coomassie) sind die in diesem Versuch verwendeten rekombinanten Proteine (Raver1, PTB1, Raver2 und BSA) dargestellt. (B) Im „Far Western“ wurden PTB1, Raver1, Raver2 und BSA (Negativkontrolle) in steigenden Konzentrationen (0,8- 6,4 pmol) an einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit rekombinantem PTB1 (links), Raver1 (Mitte) und Raver2 (rechts) inkubiert. Die überschichteten Proteine wurden jeweils in einer Konzentration von 3 µg/ml mit der Membran inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper (BB7, 5G6 und 4C8) nachgewiesen. PTB1 bindet an Raver1 und Raver2 und umgekehrt. Raver1 und Raver2 interagieren nicht miteinander.

Eine semiquantitative Analyse der Raver2-PTB1-Interaktion erfolgte unter nativen Pufferbedingungen mittels „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA). Für diesen Versuch wurden 25 pmol rekombinantes PTB1 auf einer Microtiter-Platte immobilisiert und mit ansteigenden Konzentrationen (1-200 pmol) Raver2 überschichtet. Der Nachweis von gebundenem Raver2-Protein erfolgte über den BiPro-Antikörper 4A6. Als Kontrolle dienten BSA (C1, C2), und Proben ohne Erstantikörper (C3).

Die Ergebnisse des ELISA zeigen eine signifikante Bindung von Raver2 an PTB1, wobei die Interaktion bei einem Verhältnis von 50 pmol Raver2 zu 25 pmol PTB1 die Sättigung erreicht

(siehe Abbildung 3.24). Dieses Ergebnis zeigt, dass Raver2 und PTB1 nicht in einem 1:1 Verhältnis aneinander binden. Es ist anzunehmen, dass sie oligomere Strukturen miteinander ausbilden können. Für PTB1 konnte bereits eine Dimerisierung und Oligomerisierung gezeigt werden (Oh et al., 1998). Für Raver2 deuten Crosslink-Experimente darauf hin, dass Raver2 ebenfalls dimerisieren kann (Dipolmarbeit S. Swiniarski, 2005).

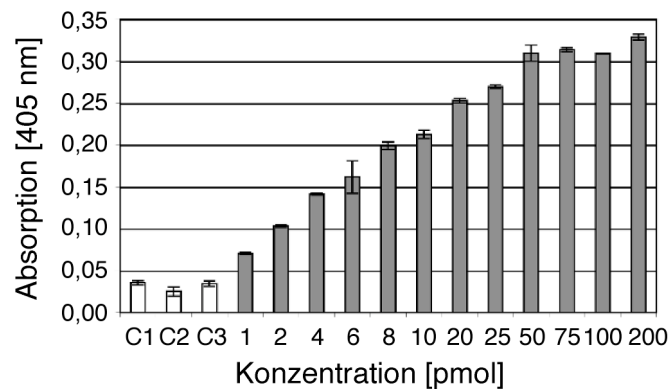


Abbildung 3.24: Raver2 interagiert mit PTB1 im ELISA. PTB1 (25 pmol) wurden an einer ELISA-Platte immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen (von 1 bis 200 pmol) an rekombinanten Raver2 überschichtet. Gebundenes Protein wurde mit dem BiPro-Antikörper 4A6 und einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Die dargestellten Balken stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit Standardabweichung dar. C1: Kontrolle ohne PTB1, C2: Kontrolle ohne Raver2, C3: Kontrolle ohne Erstantikörper.

Bei den vorangegangenen Interaktionsstudien war immer einer der beiden Bindungspartner immobilisiert. Eine Assoziation von Raver2 und PTB1 sollte daher abschließend in Lösung mittels eines „Pull-down“-Experiments demonstriert werden. Hierzu wurden PTB1 und als Negativkontrolle BSA an bromcyanaktivierte Sepharose gekoppelt und mit rekombinantem Raver2 inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert, mehrfach gewaschen und anschließend in Probenpuffer aufgenommen. „Western Blot“-Analysen zeigten, dass Raver2 spezifisch durch PTB1, nicht durch BSA präzipitiert wird (siehe Abbildung 3.25). Die Bindung von Raver2 an PTB1 kann somit auch in Lösung erfolgen.

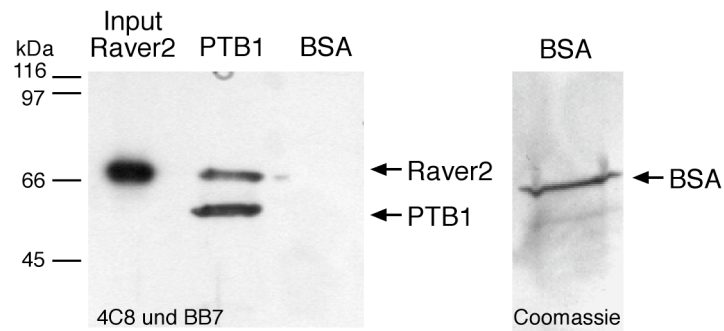


Abbildung 3.25: Raver2 präzipitiert mit PTB1 in „Pulldown“-Experimenten. Rekombinanter Raver2 (100 pmol, „Input“) wurde mit PTB1- (PTB1) und BSA-gekoppelter (BSA) Sepharose inkubiert. Gebundenes Protein wurde im SDS-Gel mit anschließendem „Western Blot“ mit dem Raver2-Antikörper 4C8 und dem PTB-Antikörper BB7 simultan analysiert (links). Rechts ist in einem Coomassie-Brilliantblau-gefärbten Gel (Coomassie) gezeigt, dass BSA erfolgreich an Sepharose gekoppelt wurde. Rekombinanter Raver2 kann spezifisch mit rekombinanten PTB1 aus der Lösung präzipitiert werden.

In „Overlay“-Experimenten sollte untersucht werden, ob die RRM's von Raver2 für die Interaktion mit PTB1 verantwortlich sind. Hierzu wurden 10 pmol rekombinantes PTB1 und als Negativkontrolle BSA auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit *in vitro* translatierten [35 S]-markierten Raver2-Konstrukten, sowie Raver1 inkubiert. Die Autoradiographie der „Overlay“-Experimente ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

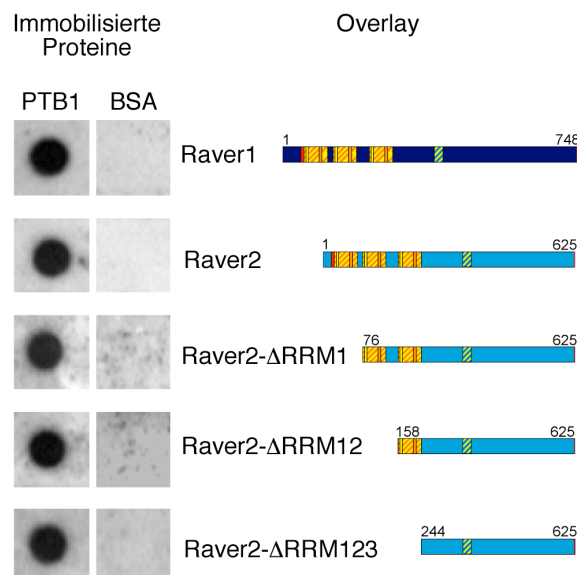


Abbildung 3.26: Raver2 bindet nicht über die RRM's an PTB1. Jeweils 10 pmol PTB1 und BSA wurden auf Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit *in vitro* translatierten [35 S]-markierten Raver1-, Raver2-, Raver2-ΔRRM1-, Raver2-ΔRRM12- und Raver2-ΔRRM123-Konstrukten inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Wie erwartet, binden Raver1 und Raver2 auch in diesem Test an PTB1. Auch die verwendeten Deletionskonstrukte Raver2- Δ RRM1, Raver2- Δ RRM12 und Raver2- Δ RRM123 binden an PTB1, nicht jedoch an die Negativkontrolle BSA. Die RRM1s von Raver2 sind somit nicht an der Bindung von PTB1 beteiligt. Vielmehr erstreckt sich der Bindungsbereich auf die Aminosäuren 244-625. Auch für PTB1 konnte der Bindungsbereich im „Far Western“ näher eingegrenzt werden. Hierzu wurden zwei PTB1-Deletionsfragmente hergestellt, die zum einen die ersten beiden und zum anderen die letzten beiden RRM1s beinhalten (siehe Abbildung 3.27 A). Die im „Far Western“ eingesetzten rekombinanten Proteine sind in einem Coomassie-Brilliantblau-gefärbten Gel gezeigt (Abbildung 3.27 B). Die PTB1-Deletionskonstrukte (PTB1-RRM12 und PTB1-RRM34), sowie Wildtyp-PTB1 und als Negativkontrolle BSA wurden auf Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit Raver1 (Abbildung 3.27 C links) oder Raver2 (Abbildung 3.27 C rechts) überschichtet.

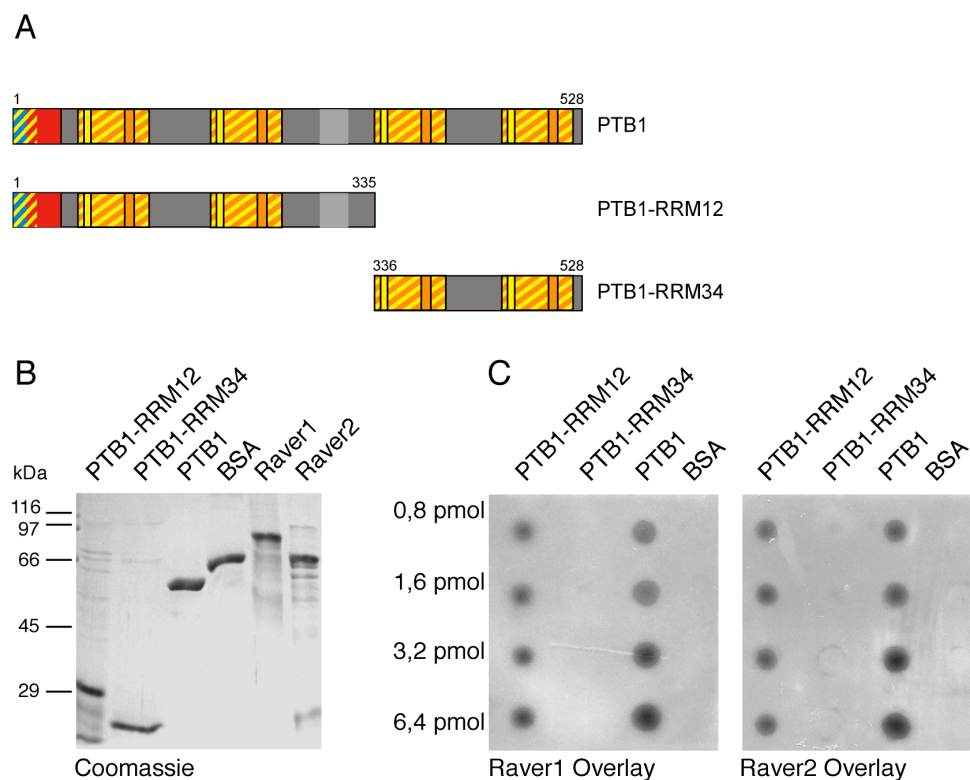


Abbildung 3.27: PTB1 bindet über die RRM1 und 2 an Raver1 oder Raver2. (A) Schematische Darstellung der verwendeten PTB1-Konstrukte. (B) Abbildung der im „Far Western“ eingesetzten rekombinanten Proteine, PTB1, PTB1-RRM12, PTB1RRM23, Raver1, Raver2 und BSA. (C) „Far Western“. Immobilisierte PTB-Konstrukte und als Negativkontrolle BSA wurden mit Raver1 (links) oder Raver2 (rechts) überschichtet. Der Nachweis der Raver-Proteine erfolgte mit dem 5G6- oder 4C8-Antikörper.

Die gebundenen Raver-Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Raver1 und Raver2 binden wie erwartet an Wildtyp-PTB1 und an das PTB1-Deletionskonstrukt PTB1-RRM12, nicht jedoch an PTB1-RRM34. Somit wird die Bindung über die ersten beiden RRM's und die „Linker“-Region vermittelt und befindet sich im Aminosäurebereich 1-335 von PTB1.

3.2.4.2 Assoziation von Raver2 und PTB in Zellen

Erste Hinweise darauf, ob die *in vitro* identifizierte Interaktion von Raver2 und PTB auch *in vivo* relevant sein kann, geben Kollokalisationsstudien. Hierzu wurden Immunfluoreszenzanalysen in HeLa-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit dem EGFP-Raver2-Konstrukt transfiziert und endogenes PTB wurde mit dem monoklonalen PTB-Antikörper BB7 nachgewiesen (siehe Abbildung 3.28). Beide Proteine sind im Nukleoplasma lokalisiert, unter Aussparung der Nukleoli. Eine Akkumulation in diskreten, Nukleoli-assoziierten Strukturen, den „perinucleolar compartments“ (PNC) ist für beide Proteine evident. Eine Übereinanderlagerung beider Aufnahmen zeigt, dass es sich um dieselben Strukturen handelt. Eine Anreicherung von PTB und Raver1 in den PNC wurde bereits beschrieben (Hüttelmaier et al., 2001). Raver2 koloalisiert ebenfalls mit PTB in diesen Strukturen und interagiert möglicherweise hier mit PTB.

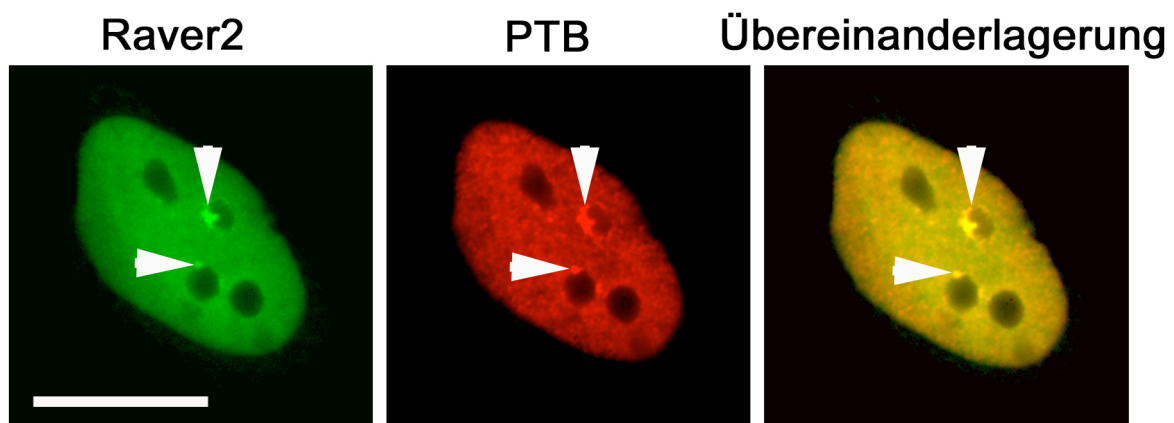


Abbildung 3.28: Raver2 und PTB koloalisieren in den „perinucleolar compartments“ (PNC) im HeLa-Zellkern. Fluoreszenzanalysen von transfizierten HeLa-Zellen mit dem EGFP-Raver2-Konstrukt (links) und der Gegenfärbung von endogenem PTB mit dem monoklonalen PTB-Antikörper BB7 und einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper (Mitte). Die Übereinanderlagerung der beiden Bilder ist rechts dargestellt. Die Pfeilspitzen weisen auf die Koloalisation von Raver2 und PTB in den PNC hin. Der Balken entspricht 10 μ m.

Letzteres sollte in Koimmunpräzipitationen untersucht werden. Für die Koimmunpräzipitation wurden C2C12-Zellen mit einem EGFP-FLAG-Raver2-Konstrukt transfiziert. Nach *in situ* "Crosslinking" zur Stabilisierung von Proteinkomplexen wurde eine Immunpräzipitation mit dem FLAG-Antikörper durchgeführt. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem „Western Blot“. Das präzipitierte EGFP-FLAG-Raver2-Fusionsprotein konnte mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. Endogenes PTB, das mit dem Fusionsprotein kopräzipitierte, konnte mit dem polyklonalen PTB-Antikörper nachgewiesen werden. Wie bereits in Abbildung 3.05 gezeigt, erkennt dieser Antikörper mindestens zwei der in den Mauszellen exprimierten PTB-Isoformen, und mindestens zwei davon wurden auch aus C2C12-Zellen im Komplex mit Raver2 präzipitiert (siehe Abbildung 3.29). Die Negativkontrolle, in der untransfizierte Zellen verwendet wurden, zeigt, dass der eingesetzte FLAG-Antikörper keine Kreuzreaktion mit PTB aufweist, und dass PTB nicht unspezifisch an die zur Präzipitation der Komplexe eingesetzte Protein-G-Sepharose bindet (siehe Abbildung 3.29). Die Ergebnisse der Immunpräzipitation belegen, dass endogene PTB-Isoformen mit Raver2 kopräzipitiert werden können. Raver2 und PTB können offenbar unter physiologischen Bedingungen *in vivo* im gleichen Komplex vorkommen.

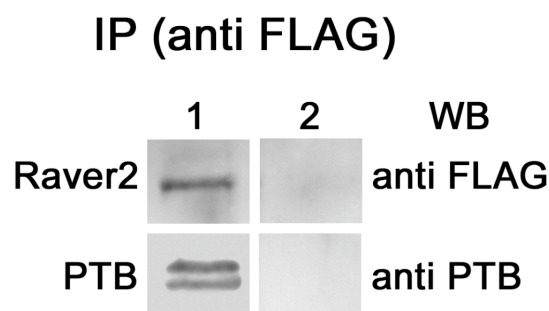


Abbildung 3.29: Raver2 und PTB liegen in gemeinsamen Komplexen vor. C2C12-Zellen wurden mit EGFP-FLAG-Raver2 transfiziert. Das Raver2-Fusionsprotein wurde nach *in situ* „Crosslinking“ aus dem Zelllysate mittels FLAG-Antikörper präzipitiert (IP) und das Präzipitat nach SDS-PAGE im „Western Blot“ (WB) analysiert. Der Nachweis des Raver2-Fusionsproteins erfolgte mit dem FLAG-Antikörper (oben). Das kopräzipitierte endogene PTB (unten) wurde mit dem polyklonalen PTB-Antikörper nachgewiesen. Die PTB-Doppelbande stellt unterschiedlich große PTB-Isoformen dar, die von dem polyklonalen Antikörper erkannt werden. PTB kopräzipitiert mit Raver2 (1). Als Kontrolle diente Zelllysate nicht transfizierter Zellen (2).

Raver2 und Raver1 sind also auch in Bezug auf ihre Interaktion mit PTB homolog. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster (siehe Kapitel 3.2.3) ist jedoch anzunehmen, dass in der Raver1-defizienten Maus, Raver2 nicht generell die Funktion von Raver1 übernehmen kann.

3.3 Analysen zur RNA-Bindung von Raver1 und Raver2

Die Mitglieder der hnRNP-Familie sind an vielen Prozessen der RNA-Biogenese beteiligt und vermitteln oder stellen die wichtigen Protein-RNA-Interaktionen selbst her. Raver1 und Raver2 wurden in die Familie der hnRNPs eingeordnet da sie über die charakteristischen RNA-Erkennungsmotive verfügen. Neben der klassischen Funktion der RRM, die Vermittlung der Protein-RNA-Interaktion, fungieren sie auch als Bindungsdomänen für Liganden oder bewirken die Selbssassoziation (Perez et al., 1997a). Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob Raver1 und Raver2 die Fähigkeit besitzen, RNA zu binden.

3.3.1 Nachweis von Protein-RNA-Komplexen durch UV-„Crosslink“ und Immunpräzipitation (CLIP)

Die potenzielle Raver1-RNA-Bindung wurde mit Hilfe der UV-„Crosslink“ und Immunpräzipitations-Methode (Ule et al., 2003), kurz CLIP genannt, analysiert (siehe Kapitel 2.3.16). Als Positivkontrolle wurde die PTB-RNA-Bindung analysiert, da für PTB als polypyrimidinbindendes Protein bereits eine RNA-Bindung beschrieben wurde (Garcia-Blanco et al., 1989). Als Zellsystem wurden humane HeLa-Zellen verwendet. Da der monoklonale PTB-Antikörper BB7 PTB nicht aus Mauszellen präzipitiert (Daten nicht gezeigt), konnten hier nicht die murinen C2C12-Zellen verwendet werden, in denen Raver1 gut charakterisiert ist.

Die Präzipitation Raver1-haltiger Komplexe wurde mit dem 7D3-Antikörper durchgeführt, der auch humanen Raver1 erkennt (siehe Abbildung 3.30). Die CLIP-Versuche wurden zum einem mit UV-Licht bestrahlten Zellen und zum anderen als Negativkontrolle mit nicht bestrahlten Zellen durchgeführt. Der Nachweis der radioaktiv markierten, am Protein gebundenen RNA erfolgte über Autoradiographie. Die immunpräzipitierten Proteine wurden auf der gleichen Membran über spezifische Antikörper nachgewiesen („Western Blot“). Sowohl die Präzipitation der in HeLa-Zellen exprimierten endogenen PTB-Isoformen (siehe Abbildung 3.30 A links) als auch des endogenen Raver1-Proteins (siehe Abbildung 3.30 A rechts) war in UV-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen erfolgreich. Bei erfolgreich durchgeführtem CLIP, müssen die durch die radioaktiv markierte RNA identifizierten Protein-RNA-Komplexe ein verändertes Laufverhalten im Gel und ein höheres Molekulargewicht aufweisen als das ungebundene Protein. Außerdem sollte in der Autoradiographie eine diffuse Bande erkennbar sein, da unterschiedlich lange RNAs an den Proteinen gebunden sind (Ule et al., 2003). In der

Autoradiographie konnte für PTB nur nach UV-„Crosslink“ ein starkes Signal nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.30 B links). Die diffuse Bande zeigt wie erwartet ein langsames Laufverhalten im Gel als das RNA-freie Protein. Für Raver1 trat selbst nach 12-stündiger Exposition kein Signal in der Autoradiographie auf. Die Ergebnisse mit PTB belegen, dass die Durchführung der CLIP-Methode erfolgreich war. Nur nach einem UV-„Crosslink“ wurden PTB-RNA-Komplexe generiert und durch den Antikörper in diesen Proben präzipitiert. Im Fall von Raver1 konnte wie bei der Negativkontrolle keine RNA-Bindung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.30).

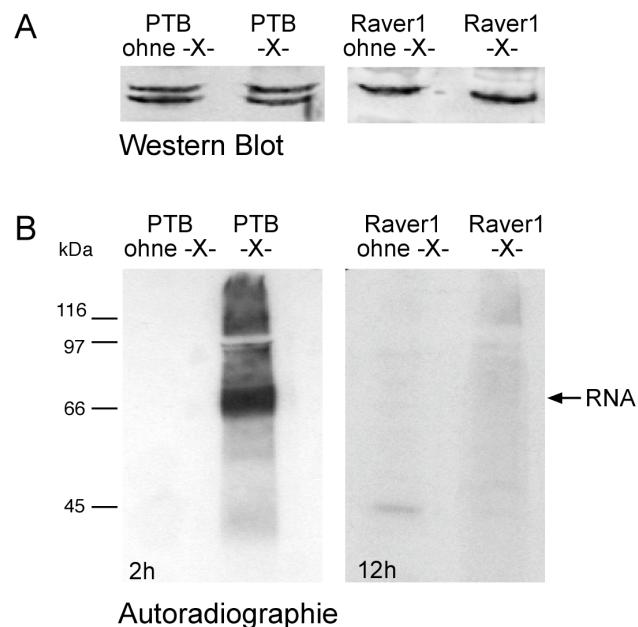


Abbildung 3.30: Detektion von PTB-RNA-Komplexen in HeLa-Zellen. (A) Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit dem PTB-Antikörper BB7 (links) oder dem Raver1-Antikörper 7D3 (rechts) nachgewiesen. Der monoklonale PTB-Antikörper detektiert in HeLa-Zellen mehrere PTB-Isoformen, was an der PTB-Doppelbande zu erkennen ist. (B) In der Autoradiographie der RNA-Bindung sind jeweils in der linken Spur die Ansätze mit nicht- (ohne -X-) und in der rechten Spur die Ansätze UV-behandelter Zellen (-X-) dargestellt. Der PTB-CLIP ist links nach zwei Stunden Exposition und der Raver1-CLIP rechts in einer 12-stündigen Exposition abgebildet. Der Pfeil deutet auf die PTB-RNA-Komplexe.

Um sicherzustellen, dass das negative CLIP-Ergebnis für Raver1 nicht an dem verwendeten Antikörper beziehungsweise an dem verwendeten Zellsystem lag, wurden weitere CLIP-Analysen in murinen C2C12-Zellen mit beiden Raver1-Antikörpern (5G6 und 7D3) durchgeführt. Mit beiden Raver1-Antikörpern wurde endogener Raver1 präzipitiert, es konnten jedoch auch in C2C12-Zellen keine Raver1-RNA-Komplexe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In weiteren CLIP-Analysen wurde untersucht, ob durch die Inkubation mit RNase potenzielle Raver1-RNA-Komplexe zerstört werden. Es wurden daher CLIP-Versuche mit

unterschiedlichen RNase-Verdünnungen durchgeführt. Diese zeigten jedoch ebenfalls keine Raver1-RNA-Bindung (Daten nicht gezeigt). Zur Beseitigung von hochmolekularen Bestandteilen wie Ribosomen und großen RNPs, findet eine Zentrifugation des Zelllysats bei 300 000 x g vor der eigentlichen Immunpräzipitation statt. Um auszuschließen, dass während dieser Zentrifugation potenzielle Raver1-RNA-Komplexe sedimentieren und damit der Analyse entgehen, wurde die Zentrifugation in weiteren CLIP-Versuchen bei unterschiedlichen g-Zahlen durchgeführt. Auch diese Versuche führten nicht zum Nachweis einer Raver1-RNA-Bindung (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der CLIP-Methode in den hier verwendeten Zellsystemen keine endogene Raver1-RNA-Bindung nachgewiesen werden konnte. Diese negativen Ergebnisse sind nicht auf methodische Mängel der CLIP-Methode zurückzuführen.

3.3.2 Untersuchungen zu Protein-RNA-Interaktionen *in vitro*

Mit der *in vitro* Protein-RNA UV-, „Crosslink“-Methode (siehe Kapitel 2.3.17) kann die RNA-Bindungsfähigkeit von rekombinanten Proteinen an total-RNA untersucht werden. Das Prinzip dieses Versuches basiert im Wesentlichen auf der oben beschriebenen CLIP-Methode. Die verwendeten rekombinanten Proteine werden mit total-RNA-Isolaten inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und anschließend einem RNase-Verdau unterzogen. Nach der radioaktiven Markierung der am Protein gebundenen RNA und der gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe Kapitel 2.3.3.3), sowie dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wird gebundene RNA mittels Autoradiographie nachgewiesen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine Immunpräzipitation erforderlich ist und der Nachweis von Protein-RNA-Komplexen direkt erfolgen kann.

Zur Etablierung des *in vitro* Protein-RNA UV-, „Crosslinks“- wurde dieser Versuch zunächst mit rekombinanten Proteinen durchgeführt, für die eine RNA-Bindung bereits nachgewiesen war. Neben PTB1 wurde auch die RNA-Bindung von hnRNP C2 untersucht, das rein kernständig ist und wahrscheinlich an der nukleären Retention von prä-mRNA beteiligt ist (Nakielny und Dreyfuss, 1996). Rekombinantes hnRNP C2-Protein, versehen mit N-terminalen His- und FLAG-, „tags“ wurde freundlicherweise von Dr. S. Illenberger zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrollen dienten BSA und die Metavinculin-Schwanzdomäne (Metavinculin-Tail, MVT). Die verwendeten rekombinanten Proteine wurden mit total-RNA, isoliert aus neonatalen Mausgehirn, 30 min inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Nach der radioaktiven Markierung der RNA wurden die Proben im SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch „Western Blot“ (siehe Abbildung 3.31 A links) und die RNA durch Autoradiographie

nachgewiesen (siehe Abbildung 3.31 A rechts). Rekombinantes hnRNP C2-Protein wurde durch den FLAG-Antikörper markiert und weist neben der Hauptbande bei 43 kDa zwei charakteristische Degradationsbanden auf (Wan et al., 2001). Rekombinantes PTB1 wurde mit dem PTB-spezifischen Antikörper BB7 nachgewiesen. Für beide Proteine konnte in der Autoradiographie eine RNA-Bindung nach UV-„Crosslink“ nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.31 A rechts). Der als Negativkontrolle eingesetzte MVT zeigt nach 12-stündiger Exposition ein schwaches Signal in der Autoradiographie. Eine Ursache für diese als unspezifisch einzustufende Interaktion liegt wahrscheinlich darin, dass der MVT stark basische Bereiche aufweist, die über Ionenwechsel-Wirkungen an die saure RNA binden.

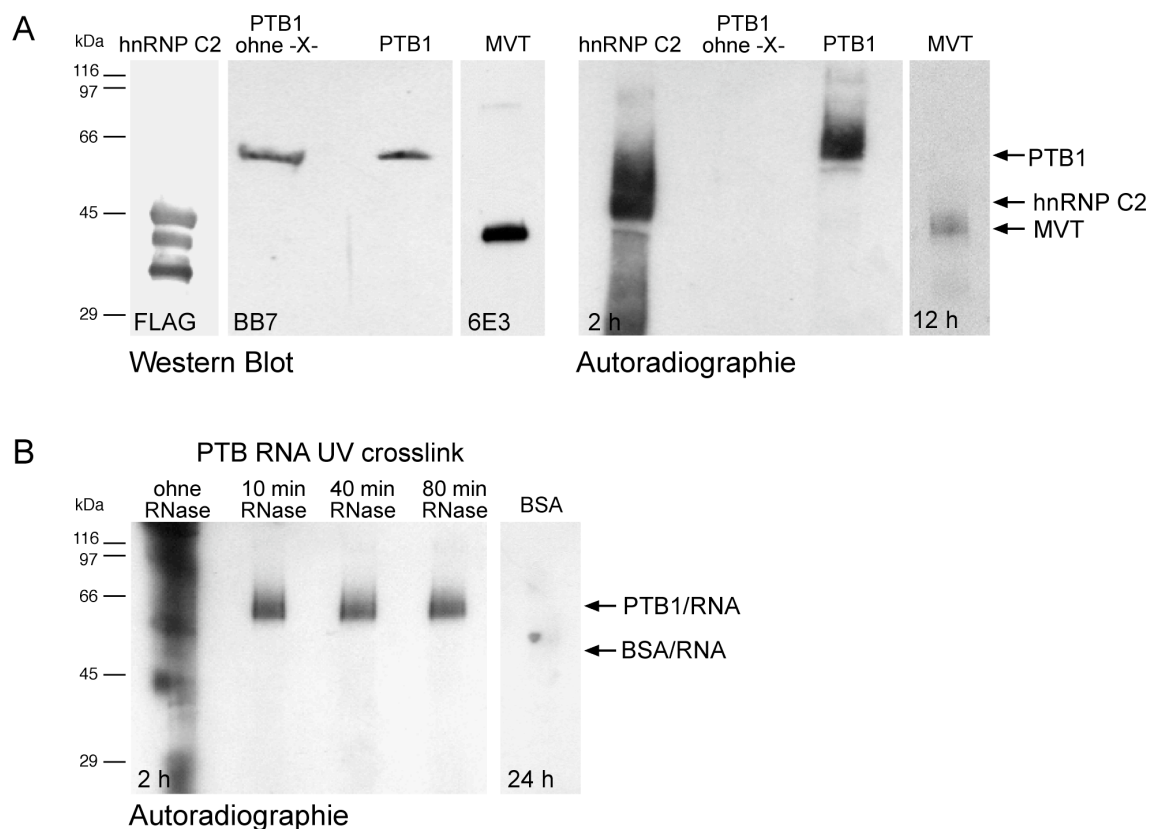


Abbildung 3.31: Mitglieder der hnRNP-Familie zeigen eine Protein-RNA-Bindung in *in vitro* Protein-RNA UV-„Crosslink“ Experimenten. „Western Blot“ für die rekombinanten Fusionsproteine FLAG-hnRNP C2 und FLAG-PTB1 mit Antikörper gegen FLAG bzw. PTB. Die Metavinculin-Schwanzdomäne (Metavinculin-Tail, MVT) wurde mit dem MVT spezifischen monoklonalen Antikörper 6E3 nachgewiesen (A links). Die an den Proteinen gebundene radioaktiv markierte RNA ist in der Autoradiographie dargestellt (A rechts). In B ist der PTB1-RNA UV-„Crosslink“ mit unterschiedlichen Zeiten der RNase-Inkubation dargestellt. BSA wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Pfeile weisen auf die PTB1-RNA-Komplexe und die erwartete Position der BSA-RNA-Komplexe hin.

Anhand der PTB1-RNA-Interaktion wurde untersucht, ob der RNase-Verdau essenziell ist und ob eine Inkubation mit RNase über einen längeren Zeitraum dazu führt, dass die am Protein gebundene RNA komplett abgebaut wird. Hierzu wurden zum einen ein Ansatz ohne RNase-Behandlung durchgeführt und zum anderen eine Inkubation mit RNase über einen Zeitraum von 80 min. Aus Abbildung 3.31 B wird ersichtlich, dass die RNase-Behandlung wichtig ist, da sonst hochmolekulare Protein-RNA-Komplexe vorhanden sind, die eine schlechte Trennung im SDS-Gel aufweisen. Eine Inkubation mit RNase, länger als 80 min beeinflusst die Protein-RNA-Bindung jedoch nicht.

Obwohl die Ergebnisse des CLIPs für Raver1 aus HeLa- und C2C12-Zellen negativ ausgefallen sind, muss dies nicht zwangsläufig bedeuten, dass Raver1 keine RNA binden kann. Es wäre durchaus denkbar, dass Raver1 nur unter bestimmten Bedingungen mit RNA assoziiert vorliegt, die in den untersuchten permanenten Zelllinien nicht gegeben sind.

Aus diesem Grund wurde der *in vitro* Protein-RNA UV-„Crosslink“ mit rekombinantem Raver1-Protein, versehen mit dem FLAG-„tag“ durchgeführt. Wildtyp-Protein und ein C-terminales Deletionsfragment, dem die RRM's fehlen (Raver1-ΔN, Aminosäuren 442-748; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Zieseniß) wurden mit total-RNA, isoliert aus neonatalen Mausgehirn, inkubiert. Bei dieser Versuchsreihe dienten BSA als Negativkontrolle und PTB1 als Positivkontrolle. Die in diesem Versuch eingesetzten Proteine wurden in einer „Western Blot“-Analyse mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen (siehe Abbildung 3.32 A). Der Nachweis der durch das Protein gebundenen RNA erfolgte wieder über Autoradiographie und ist in Abbildung 3.32 B dargestellt, wobei links ein Film nach zweistündiger Exposition abgebildet ist, während rechts die Exposition 24 Stunden betrug. Eine deutliche RNA-Bindung ist nach zweistündiger Exposition für PTB1 nachweisbar, die BSA-Kontrolle ist negativ. Leichte Signale sind auch für Raver1-Wildtyp und das Deletionsfragment nach zwei Stunden sichtbar, was insbesondere nach 24-stündiger Exposition deutlich wird (siehe Abbildung 3.32 B). Die Signalstärken sind für Gesamt-Raver1 und das Deletionsfragment annähernd gleich, was auch durch Cerenkov-Zählung der inkorporierten Radioaktivität bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

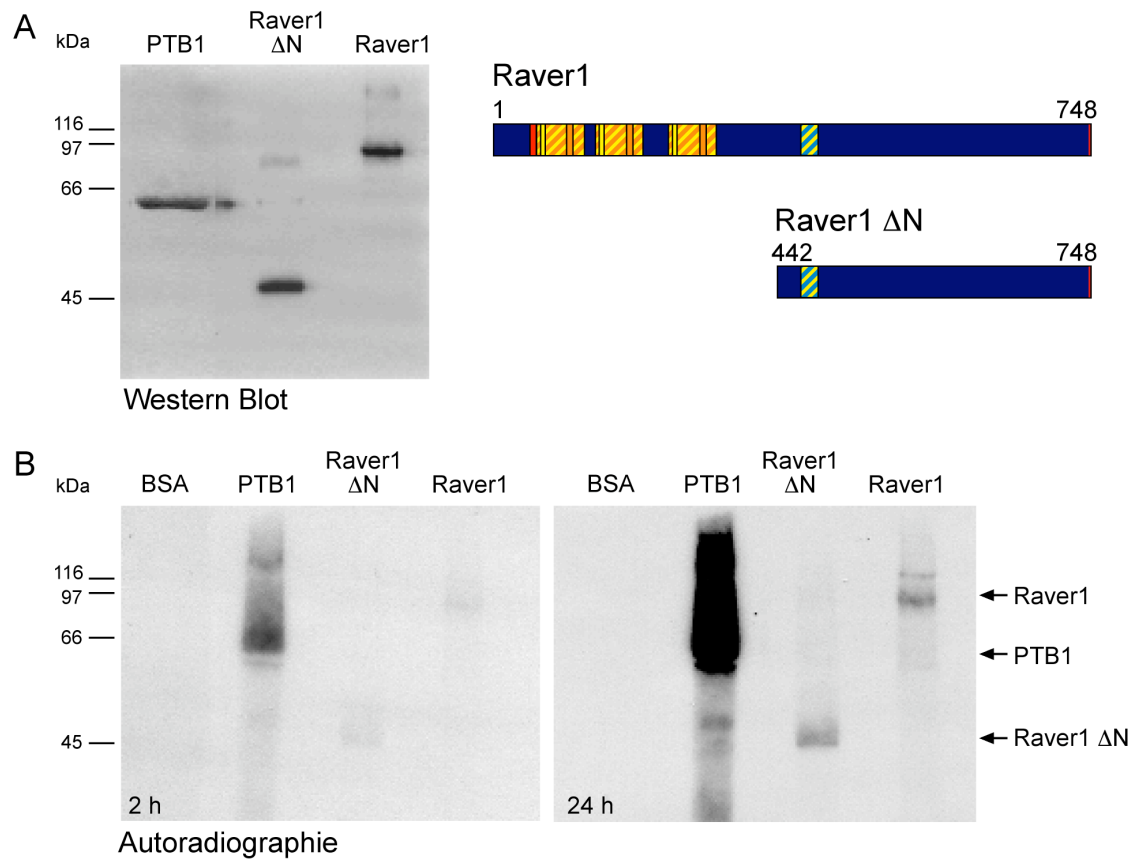


Abbildung 3.32: Raver1 zeigt eine schwache falschpositive RNA-Bindung im Protein-RNA UV-„Crosslink“. (A) „Western Blot“ der verwendeten Proteine, nachgewiesen mit dem FLAG-Antikörper. Wildtyp-Raver1 und Raver1- Δ N sind rechts abgebildet. (B) Autoradiographie der potenziellen Protein-RNA-Komplexe nach UV-„Crosslink“ nach zweistündiger (links) und 24-stündiger (rechts) Exposition.

Da das Deletionskonstrukt Raver1- Δ N keine RRM_s beinhaltet, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem beobachteten Signal um eine unspezifische Protein-RNA-Assoziation handelt. Gleiches gilt demzufolge für das Raver1-Gesamtprotein. Eine ähnliche unspezifische Bindung war bereits für den MVT beobachtet worden (vergleiche Abbildung 3.31 A). Beiden Raver1-Proteine sind stark basisch, der isoelektrische Punkt (pI) von Wildtyp-Raver1 beträgt 8,73 und der pI des Raver1- Δ N-Proteins beträgt 10,26. Auch hier ist daher eine ladungsbedingte Assoziation wahrscheinlich.

Auch eine mögliche Raver2-RNA-Bindung wurde in Protein-RNA UV-„Crosslink“-Experimenten in Analogie zu Raver1 untersucht. PTB1 diente in diesem Versuchsansatz ebenfalls als Positivkontrolle. Die eingesetzten Proteine wurden im „Western Blot“ zum einem mit einem PTB-spezifischen- (BB7) und zum anderem mit dem Raver2-spezifischen Antikörper (4C8) nachgewiesen (siehe Abbildung 3.33 links). Die RNA-Bindung ist in der Autoradiographie dargestellt (siehe Abbildung 3.33 rechts). Es ist eine deutliche RNA-Bindung

für PTB1 erkennbar, für Raver2 kann keine RNA-Bindung nachgewiesen werden. Auch Raver2-Protein ist offenbar nicht in der Lage, *in vitro* Komplexe mit der RNA zu bilden.

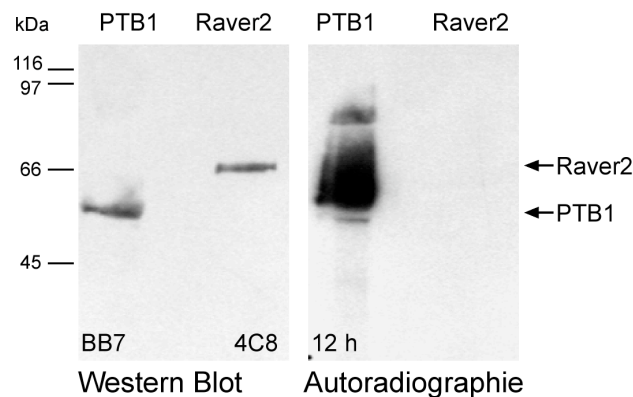


Abbildung 3.33: Rekombinanter Raver2 bindet *in vitro* nicht an RNA. Die verwendeten rekombinanten Proteine sind links dargestellt, wobei das BiPro-Raver2-Fusionsprotein mit dem monoklonalen Raver2-Antikörper 4C8 und das FLAG-PTB1-Fusionsprotein mit dem monoklonalen PTB-Antikörper BB7 simultan detektiert wurde. Der Nachweis der radioaktiv markierten, am Protein gebundenen RNA ist in der Autoradiographie mit einer Expositionszeit von 12 Stunden rechts abgebildet.

Eine weitere Methode zum Nachweis einer RNA-Bindung von Proteinen ist der Ribohomopolymer-Bindungstest. Bei dieser Methode werden potenzielle RNA-bindende Proteine mit immobilisierten Ribohomopolymeren inkubiert und bei erfolgreicher Bindung im Komplex kosedimentiert, gleichzeitig kann bestimmt werden, an welche Art von Nukleotiden die Proteine potenziell binden.

Die mögliche RNA-Bindung von Raver1 und Raver2 wurde schließlich in diesem dritten Protein-RNA-Bindungstest analysiert, wobei als Positivkontrollen erneut PTB1 und hnRNP C2 verwendet wurden (siehe Abbildung 3.34). Die auf ihre RNA-Bindung zu untersuchenden rekombinanten Proteine wurden zusammen mit je einer Ribohomopolymer-Agarose inkubiert. Um die Stringenz der Bindung der Proteine an die Ribohomopolymere zu erhöhen, wurden die Inkubationen in Anwesenheit steigender Salzkonzentrationen durchgeführt. hnRNP C2 bindet unter nicht stringenten Pufferbedingungen an alle vier Ribohomopolymere. Mit steigender Salzkonzentration ist nur noch eine Bindung an Riboguanosin (PolyG) und Ribouridin (PolyU) detektierbar. Diese Bindung stimmt mit der in der Literatur beschriebenen RNA-Bindung von hnRNP C2 überein (Swanson und Dreyfuss, 1988). PTB1 bindet entsprechend seinem Namen an Pyrimidine. Bei geringen Salzkonzentrationen bindet das rekombinante PTB1-Protein neben den Pyrimidinen auch an Riboguanosin, steigt die Salzkonzentration, findet nur noch eine Bindung an Ribouridin statt. Für beide rekombinanten Raver-Proteine konnte unter keiner der eingesetzten Salzkonzentrationen eine Bindung an eines der Ribohomopolymere detektiert

werden. Auch diese Ergebnisse lassen daher den Schluss zu, dass die Raver-Proteine nicht in der Lage sind, an RNA zu binden.

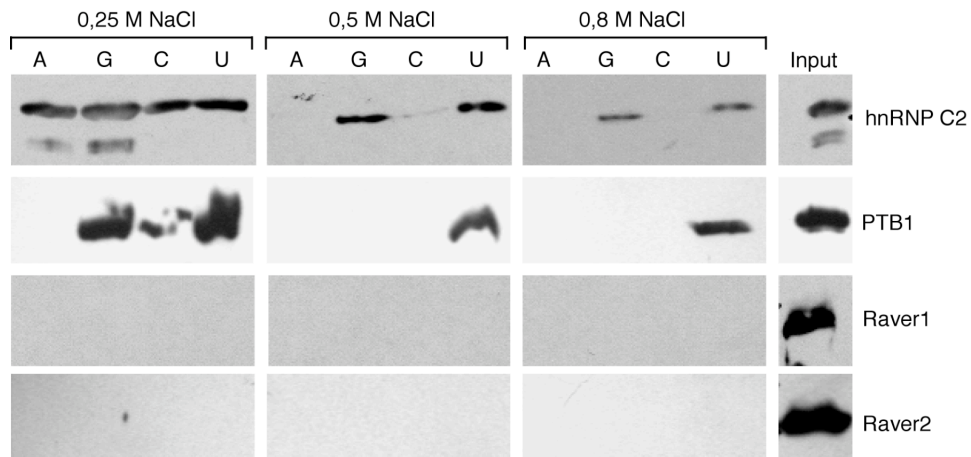


Abbildung 3.34: Raver1 und Raver2 binden nicht an Ribohomopolymere. „Western Blot“-Analysen des Ribohomopolymer-Bindungstest. Je 10 pmol rekombinantes Protein (Input) wurden mit einer der Ribohomopolymer-Agarosen (Riboadenosin- (A), Riboguanosin- (G), Ribocytidin- (C) oder Ribouridin-Agarosen (U)) mit steigenden Salzkonzentrationen im Puffer inkubiert. Der Nachweis von gebundenem Protein nach Zentrifugation der Agarose-„Beads“ erfolgte mittels „Western Blot“-Analyse, wobei das FLAG-hnRNP C2-Fusionsprotein, das FLAG-PTB1-Fusionsprotein und das FLAG-Raver1-Fusionsprotein mit dem FLAG-Antikörper detektiert wurden. Der Nachweis des BiPro-Raver2-Fusionsproteins erfolgte durch den monoklonalen Raver2-Antikörper 4C8.

3.3.3 Der Einfluss von Raver1 und Raver2 auf die RNA-Bindung von PTB1

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die Raver-Proteine keine eigenständige RNA-Bindungsfähigkeit besitzen. Da jedoch Raver1 als Korepressor des Spleißens von PTB beschrieben wurde (Gromak et al., 2003), sollte untersucht werden, ob die RNA-Bindungseigenschaft von PTB1 durch die Anwesenheit von Raver1 oder Raver2 moduliert wird.

Zunächst wurde in einem weiteren Ribohomopolymer-Bindungstest analysiert, ob PTB1 auch in Gegenwart der Raver-Proteine an RNA bindet und trinäre Komplexe aus Raver-PTB1-RNA isoliert werden können. Raver1 und Raver2 wurden jeweils mit PTB1 und der entsprechenden Ribohomopolymer-Agarose eine Stunde inkubiert und dann die Agarose sedimentiert. Die Sedimente wurden im „Western Blot“ analysiert (siehe Abbildung 3.35). Bei geringen Salzkonzentrationen des Puffers bindet PTB1 wie bereits im vorangegangenen Versuchen an alle vier Ribohomopolymere (vergleiche Abbildung 3.34). Sowohl Raver1 (siehe Abbildung 3.35

oben) als auch Raver2 (siehe Abbildung 3.35 unten) werden kosedimentiert. Dabei korreliert die jeweilige Intensität der Raver-Bande mit der Menge an sedimentiertem PTB1.

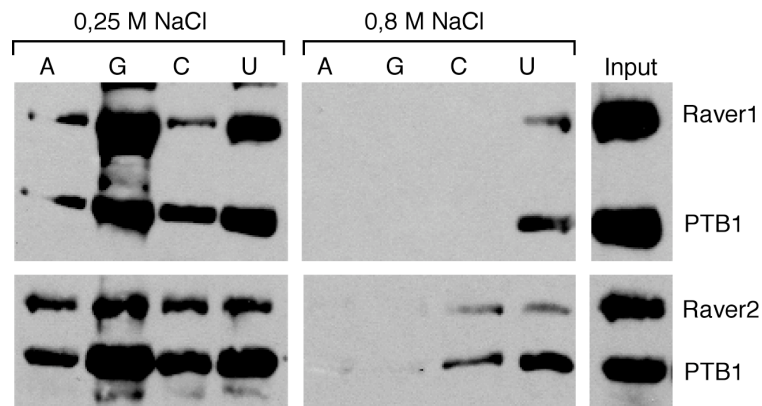


Abbildung 3.35: Raver1 und Raver2 werden zusammen mit PTB1 durch die Bindung an Ribohomopolymere präzipitiert. Riboadenosin- (A), Riboguanosin- (G), Ribocytidin- (C) und Ribouridin- Agarose (U) wurden zusammen mit 10 pmol FLAG-PTB1-Fusionsprotein und jeweils 10 pmol FLAG-Raver1-Fusionsprotein oder BiPro-Raver2-Fusionsprotein in Gegenwart von 0,25 M oder 0,8 M NaCl im Puffer inkubiert und sedimentiert. Die Analyse der an die Ribohomopolymere gebundenen rekombinanten Proteine, erfolgte mittels „Western Blot“ nach SDS-PAGE, wobei PTB1 und Raver1 mit dem monoklonalen FLAG-Antikörper und Raver2 mit dem monoklonalen Raver2-Antikörper 4C8 detektiert wurden. Der Input entspricht 10 pmol des jeweiligen Proteins und ist ebenfalls im „Western Blot“ gezeigt.

In den Proben, in denen viel PTB1 sedimentiert wurde (PolyG und PolyU) ist auch entsprechend mehr des jeweiligen Raver-Proteins kosedimentiert. Dies spricht für eine Komplexierung von Raver-PTB1. Unter stringenten Salzbedingungen (0,8 M NaCl) sind Raver1-PTB1-Komplexe nur noch in der PolyU-Probe nachweisbar. Für Raver2-PTB1-Komplexe konnte eine Bindung an PolyU und PolyC festgestellt werden.

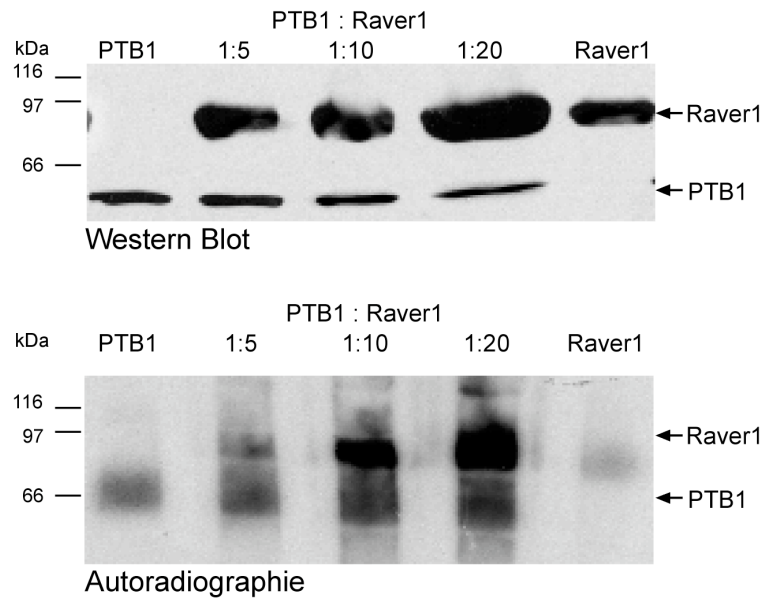
Ob Raver1 und Raver2 durch die Interaktion mit PTB1 die Fähigkeit erlangen, eigenständig an die Ribohomopolymere zu binden, kann mit diesem Versuch nicht geklärt werden. Es ist durchaus denkbar, dass Raver1 und Raver2 durch die Protein-Protein-Interaktion mit PTB1 präzipitiert werden. Die Bindung von PTB1 an Ribohomopolymere ist jedoch eindeutig auch in Anwesenheit von Raver1 und Raver2 möglich. Während sich in Gegenwart von Raver1 das qualitative Bindungsverhalten von PTB1 an die Ribohomopolymere nicht verändert, konnte in Anwesenheit von Raver2 eine vergleichsweise stärkere Bindung an PolyC festgestellt werden (vergleiche Abbildung 3.34 und 3.35). Es ist durchaus denkbar, dass die RNA-Bindung von PTB1 durch die Raver-Proteine moduliert werden kann. Dies würde auch mit der postulierten Korepressor-Funktion (Gromak et al., 2003) übereinstimmen.

Um zu untersuchen, ob die RNA-Bindung von PTB1 durch Raver1 moduliert werden kann, wurde ein Protein-RNA UV-„Crosslink“ in Anlehnung an die für Einzelproteine beschriebenen Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2).

Hierzu wurden 0,5 µg PTB1 und steigenden Mengen Raver1 (5-facher, 10-facher, 20-facher Überschuss) eingesetzt. Die Zugabe der Proteine zu 10 µg total-RNA (Mausgehirn, neonatal) erfolgte entweder direkt oder nach 30 min Präinkubation, um die Bindung von Raver1-PTB1-Komplexen zu begünstigen. In jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, mit den gleichen Chargen aller verwendeten Materialien, wurde eine Modulation der PTB1-RNA-Bindung durch Raver1 sichtbar, wie in Abbildung 3.36 dargestellt. Die eingesetzten rekombinanten Proteine sind in einer separat durchgeführten „Western Blot“-Analyse abgebildet, wobei der Ansatz, in dem nur Raver1 zum Einsatz kam, der 5-facher Menge im Vergleich zu PTB1 entspricht (siehe Abbildung 3.36 A oben). Eine repräsentative Autoradiographie der durch die Proteine gebundenen RNA ist exemplarisch für alle durchgeführten Versuche in Abbildung 3.36 A unten abgebildet. Eine Zunahme der Schwärzung ist auf der Höhe der PTB1-RNA-Komplexe zu erkennen, die mit den steigenden Mengen an Raver1 korreliert. Für Raver1 ist in dem Kontrollansatz ohne PTB1 eine schwache vermutlich falschpositive RNA-Bindung erkennbar (vergleiche Abbildung 3.32). In Gegenwart von PTB1 ist auf Höhe der Raver1-Bande ebenfalls eine sehr deutliche Zunahme des Signals zu verzeichnen, die auf die mögliche Bildung von Raver1-RNA-Komplexen hinweist. Zur Ermittlung der Menge an radioaktiv markierter RNA wurden die Bereiche, die der Schwärzung der Autoradiographie entsprachen, aus der Nitrocellulose-Membran herausgeschnitten und mittels Cerenkov-Zählung im Szintillationszähler analysiert.

In der quantitativen Auswertung der RNA-Bindung von PTB1 gingen jeweils drei unabhängige Versuche ein. Die Werte für die PTB1-Kontrolle wurden gemittelt und der Mittelwert gleich eins gesetzt. Die Werte für jede PTB1-Raver1-Probe wurden dann in Relation zu der dazugehörigen PTB1-Kontrolle gesetzt und als ein Vielfaches der PTB1-Kontrolle ausgedrückt (siehe Abbildung 3.36 B). Die Proben ohne Präinkubation der Proteine (siehe Abbildung 3.36 B links) und nach 30-minütiger Präinkubation (siehe Abbildung 3.36 B rechts) wurden dabei separat betrachtet. In beiden Versuchsreihen ist eine Zunahme des Signals bis zu einem Verhältnis PTB1:Raver1 von 1:10 zu beobachten, die im Mittel das 5-fache der PTB-Kontrolle beträgt. Bei höheren Raver1-Mengen (PTB1:Raver1, 1:20) erfolgt keine weitere Zunahme des Signals, es ist eher eine Abnahme zu verzeichnen. Aus diesen Versuchen lässt sich ableiten, dass die Anwesenheit von Raver1 und die Bildung von PTB1-Raver1-Komplexen die RNA-Bindung von PTB1 *in vitro* verstärkt. Dabei ist eine Präinkubation der beiden Bindungspartner nicht erforderlich.

A



B

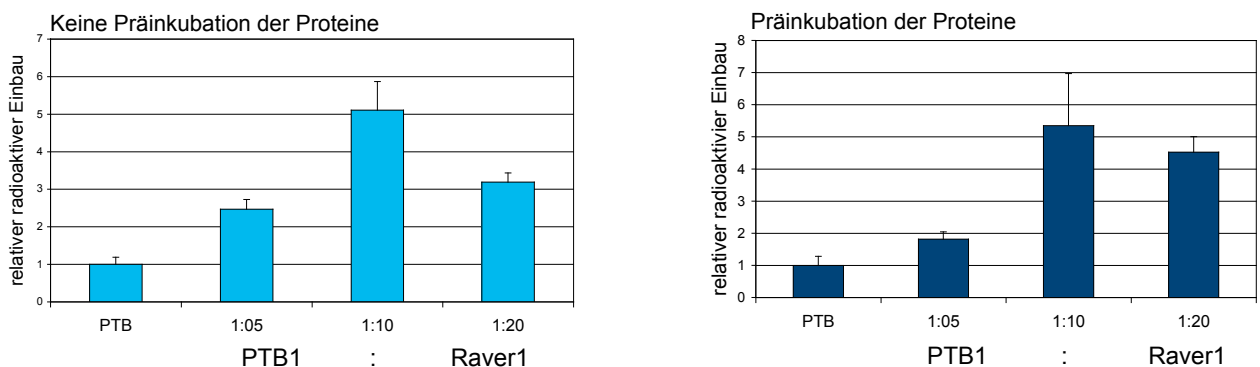


Abbildung 3.36: Raver1 verstärkt die Affinität von PTB1 zur RNA. (A) Die im UV-, „Crosslink“-verwendeten Proteine sind in einer separaten „Western Blot“-Analyse abgebildet (oben). Die rekombinanten Fusionsproteine FLAG-PTB1 und FLAG-Raver1 wurden mit dem monoklonalen PTB1-Antikörper BB7, und dem monoklonalen Raver1-Antikörper 5G6 auf derselben Membran nachgewiesen. Die Autoradiographie der an den Proteinen gebundenen RNA, ist in A (unten) dargestellt. Die Raver1-Probe ohne PTB1 entspricht der eingesetzten Raver1-Menge aus dem 1:5 Ansatz. Neben PTB1-RNA-Komplexen sind auch vermutliche Raver1-RNA-Komplexe detektierbar. Die quantitative Auswertung der RNA in der PTB1-Bande ist in B als Diagramm abgebildet, wobei links keine Präinkubation der Proteine und rechts eine Präinkubation der Proteine dargestellt ist. In dem Diagramm sind die Mittelwerte aus je drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt, die Balken stellen die errechnete Standardabweichung dar.

Die Tatsache, dass für Raver1 ein durch PTB1 verstärktes Signal beobachtet wurde, war im Kontext der vorherigen Analysen unerwartet. Um auszuschließen, dass es sich um ein falsch-positives Signal handelt, das auf unspezifischen Bindungen an das relativ hoch konzentriert eingesetzte Raver1-Protein beruht, wurden steigende Mengen an Raver1 ohne PTB1 auf ihre RNA-Bindungseigenschaften im Protein-RNA UV-, „Crosslink“- untersucht. Im Vergleich zu

PTB1 wurde die 5-fache, die 10-fache und die 20-fache Menge an rekombinanter Raver1 mit total-RNA inkubiert. Als Kontrolle und zum Abgleich der ermittelten Werte, wurde PTB1 (0,5 µg) in Abwesenheit und in Gegenwart der 10-fachen Menge an Raver1 analysiert. Die aus diesem Versuch resultierende Autoradiographie ist in Abbildung 3.37 A zu sehen.

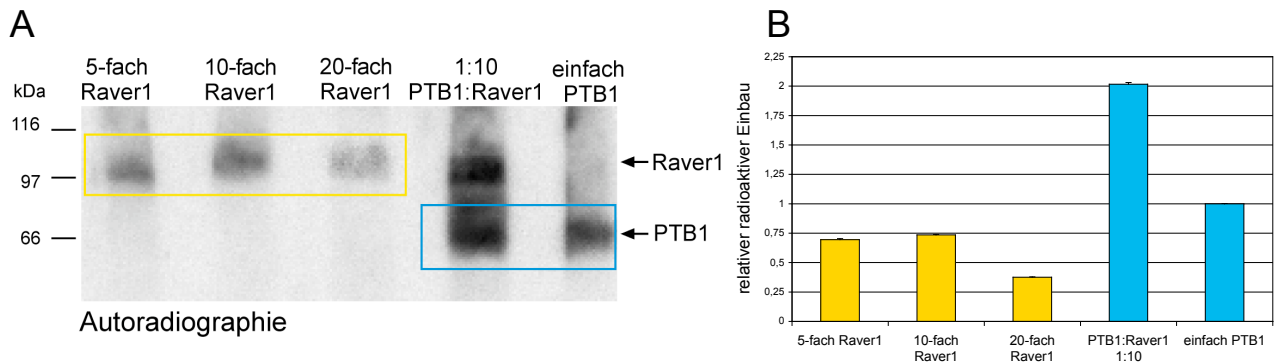


Abbildung 3.37: RNA-Bindung von Raver1 in An- und Abwesenheit von PTB1. (A) Nachweis der durch das Protein gebundenen radioaktiv markierten RNA mittels Autoradiographie. Rekombinantes Raver1-Protein wurde im 5- bis 20-fachen Überschuss im Vergleich zu dem Kontrollansatz mit PTB1 (einfach PTB1, 0,5 µg) eingesetzt. Zudem wurde die 10-fache Menge Raver1 in Gegenwart der einfachen Menge PTB1 in einem weiteren Vergleichsansatz im Vergleich zur einfachen Menge PTB1 eingesetzt. (B) Quantitative Auswertung nach Cerenkov-Zählung, als gelbes und blaues Kästchen sind die Bereiche markiert, die zur Cerenkov-Zählung eingesetzt wurden. Die Mittelwerte mit Standardabweichung wurden aus drei Messungen eines Versuches gebildet.

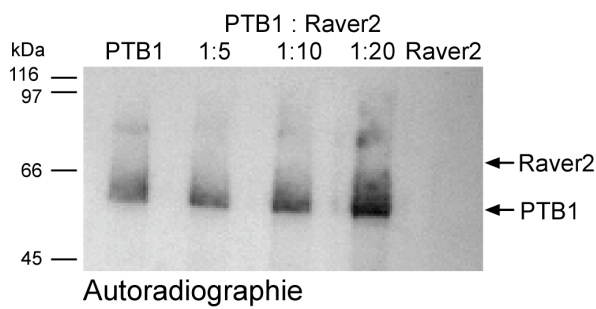
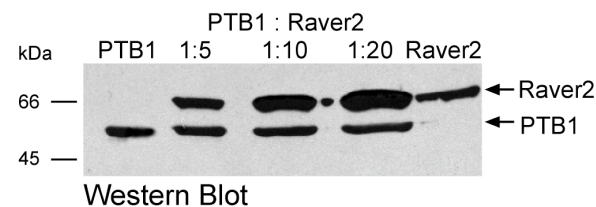
Als gelbes und blaues Kästchen sind die Bereiche markiert, die zur Cerenkov-Messung im Szintillationszähler eingesetzt wurden. Die ermittelten Werte wurden wiederum in das Verhältnis zu dem Kontrollansatz mit PTB1 gesetzt und sind in Abbildung 3.37 B graphisch dargestellt.

Obwohl die Raver1-Proteine bis zu einer 20-fach erhöhten Proteinmengen im Vergleich zu PTB1 eingesetzt wurden, weisen sie nur etwa bis zu 75% der inkorporierten Radioaktivität auf. Die PTB1-RNA-Bindung wird in diesem Versuch um den Faktor 2 in Anwesenheit von Raver1 gesteigert. Das für Raver1 nachgewiesenen Signal im Versuchsansatz mit PTB1 ist also nicht ausschließlich auf eine unspezifische RNA-Bindung des Raver1-Proteins zurückzuführen, aus methodischen Gründen wurde jedoch die inkorporierte Radioaktivität der in Abbildung 3.36 und 3.37 gezeigten Autoradiogramme nicht quantifiziert. Die qualitativen Signale lassen aber den Schluss zu, dass durch die Gegenwart von PTB1 auch das Signal für Raver1 verstärkt wird. Diese Daten geben erste Hinweise darauf, dass eine Assoziation von Raver1 mit RNA erst nach der Bindung an PTB1 möglich ist.

In analogen Versuchen wurde analysiert, ob auch für Raver2 ebenfalls eine verstärkte Assoziation von PTB1 mit RNA zu beobachten ist und ob die Anwesenheit von PTB1 dazu

führt, dass Raver2 selbst ebenfalls die Fähigkeit zur RNA-Bindung erlangt. Wie bereits für Raver1 beschrieben wurden 0,5 µg PTB1 mit steigenden Mengen an Raver2 inkubiert. Die Zugabe von 10 µg total-RNA (Mausgehirn, neonatal) erfolgte direkt oder nach 30-minütiger Präinkubation, die radioaktiv markierte RNA wurde autoradiographisch nachgewiesen. Ein repräsentativer „Western Blot“ und die dazugehörige Autoradiographie sind in Abbildung 3.38 A dargestellt.

A



B

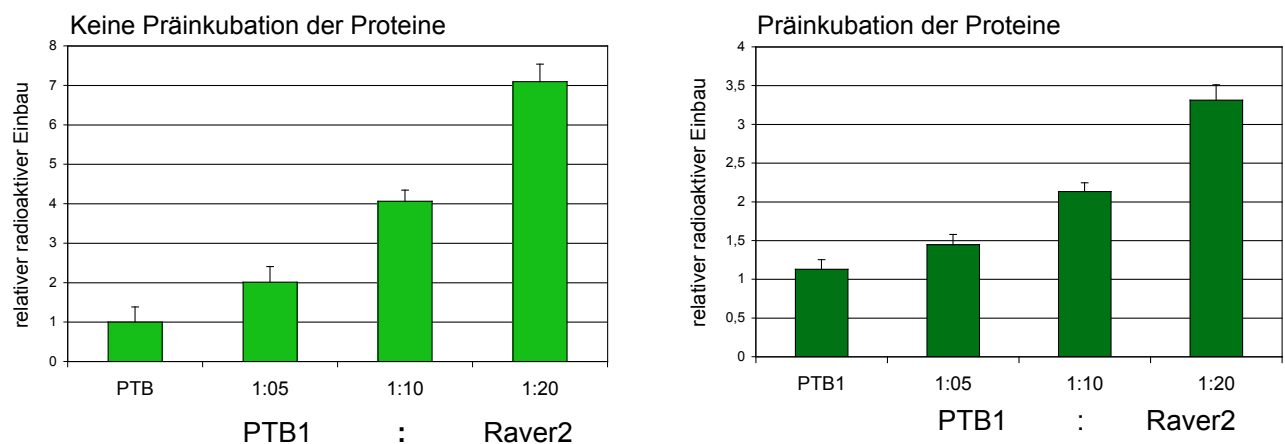


Abbildung 3.38: Raver2 erhöht die PTB1-RNA-Bindung. (A) Die in unterschiedlichen Mengenverhältnissen eingesetzten rekombinanten Proteine (FLAG-PTB1-Fusionsprotein und BiPro-Raver2-Fusionsprotein) sind im „Western Blot“ mit dem monoklonalen PTB1-Antikörper BB7 und dem monoklonalen Raver2-Antikörper 4C8 analysiert (A oben). Die durch PTB1 gebundene, radioaktiv markierte RNA ist in der Autoradiographie (A unten) abgebildet. (B) Die Quantifizierung der PTB1-RNA-Bindung nach Zugabe von Raver2, ist in den Diagrammen als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt. Links ist die Versuchsauswertung dargestellt, in der keine Präinkubation und rechts eine Präinkubation der Proteine mit der RNA stattfand.

Auch die Gegenwart von Raver2 führt zu einer verstärkten Assoziation von PTB1 mit RNA, wie an der Zunahme der Signalstärke in der Autoradiographie erkennbar ist (siehe Abbildung 3.38 A unten). Die Quantifizierung aus jeweils drei unabhängigen Versuchen entweder ohne (siehe Abbildung 3.38 B links) oder mit Präinkubation (siehe Abbildung 3.38 B rechts) der Proteine zeigt, dass in beiden Versuchsreihen eine Zunahme der PTB-gebundenen Radioaktivität zu verzeichnen war, diese jedoch deutlich höher ausfiel, wenn die Proteine nicht präinkubiert worden waren. Bei Vorinkubation der Proteine wurde die RNA-Bindung von PTB1 auf bis das 3-fache verstärkt (PTB1:Raver2, 1:20). Ohne Vorinkubation von Raver2 und PTB1 wird die PTB1-RNA-Bindung bereits bei einem 5-fachen Raver2 Überschuss (1:5) um das Doppelte, bei einem 10-fachen Raver2 Überschuss (1:10) um das 4-fache und bei einem 20-fachen Raver2 Überschuss (1:20) um das 7-fache verstärkt.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Raver1-Analysen konnte in keinem Versuch ein Signal für Raver2 in der Autoradiographie nachgewiesen werden. Die Unterschiede in den Daten im Vergleich zu Raver1 könnten zum einem darauf hinweisen, dass Raver1 und Raver2 durch PTB1 unterschiedlich in ihrem RNA-Bindungsverhalten moduliert werden. Hier sind sicherlich weiterführenden Analysen notwendig.

Um zu bestätigen, dass die Verstärkung der Assoziation von PTB1 mit RNA in Gegenwart der Raver-Proteine ein spezifischer Effekt der Raver-Proteine ist, wurden UV-„Crosslinks“ zum einem mit 0,5 µg PTB1 alleine und zum anderem in Gegenwart der 5-fachen Menge an BSA, Profilin, und hnRNP C2 durchgeführt (siehe Abbildung 3.39). Rekombinantes Profilin wurde freundlicherweise von Guido Herzberg zur Verfügung gestellt. In einem separat durchgeführten Coomassie-Brilliantblau gefärbten SDS-Gel sind die verwendeten Proteine in ihren eingesetzten Mengenverhältnissen dargestellt (siehe Abbildung 3.39 A oben). In der Autoradiographie des UV-„Crosslinks“ (siehe Abbildung 3.39 A unten) ist eine identische RNA-Bindung von PTB1 in allen Ansätzen erkennbar. BSA und Profilin binden wie erwartet keine RNA. Für hnRNP C2 ist eine RNA-Bindung erkennbar (vergleiche Abbildung 3.31 A). Der Bereich der Schwärzung, der für die Quantifizierung der von PTB1 gebundenen RNA eingesetzt wurde, ist als rotes Kästchen markiert. Die Auswertung der Quantifizierung zeigt, dass keine Verstärkung der Assoziation von PTB1 mit RNA in Gegenwart der 5-fachen Menge von BSA, Profilin oder hnRNP C2 stattfindet (siehe Abbildung 3.39 B).

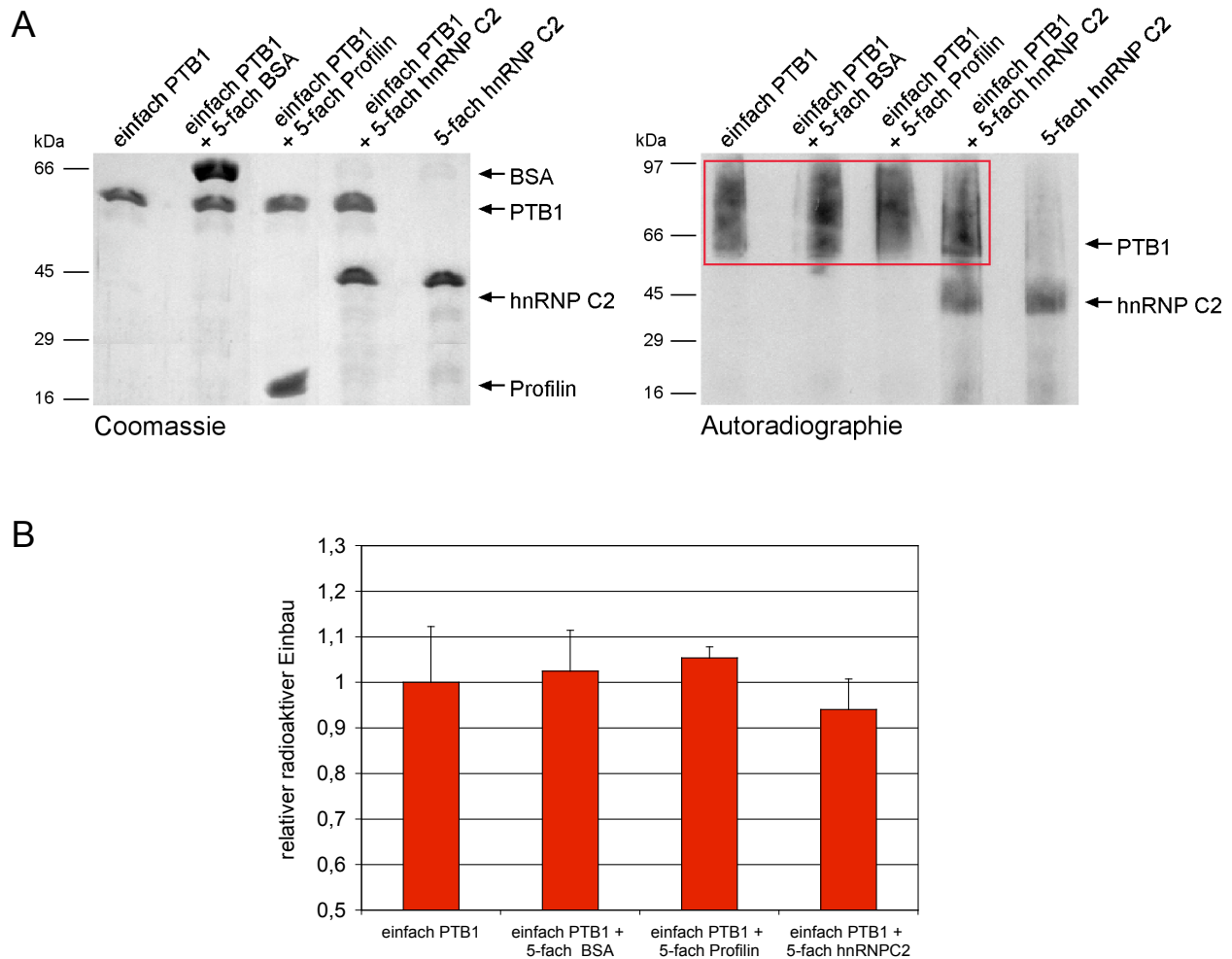


Abbildung 3.39: BSA, Profilin oder hnRNP C2 erhöhen nicht die PTB1-RNA-Bindung. Die in unterschiedlichen Mengenverhältnissen eingesetzten rekombinanten Proteine sind in einem separat durchgeführten Coomassie-Brilliantblau gefärbten SDS-Gel (Coomassie) dargestellt (A links). In der Auto-radiographie (A rechts) ist die radioaktiv-markierte RNA dargestellt. In B ist die Quantifizierung der durch PTB1 gebundenen RNA (rotes Kästchen) in Abwesenheit und in Gegenwart der 5-fachen Menge BSA, Profilin und hnRNP C2 als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung abgebildet.

Durch die Zugabe der 5-fachen Menge von Raver1 oder Raver2 ist hingegen eine signifikante Verstärkung der PTB1-RNA-Bindung erkennbar (vergleiche Abbildung 3.36 und 3.38). Die in Abbildung 3.39 dargestellten Kontrollen zeigen somit, dass der positive Einfluss beider Raver-Proteine auf die RNA-Bindung von PTB1 ein für diese Proteine spezifischer Effekt ist. Die Versuche lassen jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, ob PTB1 durch die Interaktion mit Raver1 oder Raver2 generell eine höhere Affinität für RNA aufweist, oder ob erst durch die Komplexierung die Assoziation mit spezifischen RNAs möglich wird. Auch hier sind weitere Analysen notwendig.

4 DISKUSSION

4.1 Der Verlust von Raver1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation, Adhäsion und Migration von Fibroblasten

Da die Raver1-defizienten Mäuse keinen auffällig veränderten Phänotyp aufweisen, kann Raver1 weder für die Embryonalentwicklung noch für elementare physiologische Prozesse essenziell sein. Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit war allerdings nicht auszuschließen, dass Raver1 Eigenschaften besitzt, die unter den Bedingungen der normalen Käfighaltung der Mäuse nicht erkennbar sind. Die vergleichende Analyse von Mäusen in verschiedenen physiologischen Tests (z. B. unter Stressbedingungen) ist apparativ sehr aufwendig, und es werden hohe Individuenzahlen benötigt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher eine andere Strategie verfolgt, um die biologische Funktion von Raver1 zu identifizieren. Die Herstellung Raver1-defizienter Fibroblasten-Zelllinien diente der Analyse elementarer zellulärer Prozesse wie Proliferation, Adhäsion und Migration. Im Gegensatz zum komplexen Organismus stellen Zellen ein vergleichsweise einfaches System dar und lassen sich in Kultur leicht auf verschiedene Eigenschaften hin untersuchen.

Bei der Charakterisierung Raver1-defizienter Zelllinien im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelllinie wurde jedoch festgestellt, dass weder Proliferation, noch Zelladhäsion oder das Ausbreitungsverhalten der Zellen durch den Verlust von Raver1 beeinflusst werden. In Bezug auf die Migration konnten ebenfalls keine Raver1-spezifischen Unterschiede festgestellt werden. Die beobachteten feinen Unterschiede beruhen vermutlich auf Eigenschaften der unterschiedlichen Zelllinien, die sich durch die klonale Selektion ergeben (siehe Abbildung 3.08).

Es stellt sich die Frage, wie diese (negativen) Ergebnisse mit den bisherigen Hypothesen einer möglichen Raver1-Funktion korreliert werden können. Aufgrund der RRM's wurde Raver1 in die Familie der hnRNPs eingeordnet, obwohl eine direkte RNA-Bindung bisher nicht gezeigt werden konnte. In *in vitro* Studien wurde gefunden, dass Raver1 als Korepressor von PTB das alternative Spleißen von α -Tropomyosin moduliert (Gromak et al., 2003). Raver1 könnte somit im Zellkern modulatorische Funktionen übernehmen, die nicht auf das Spleißen des α -Tropomyosins beschränkt sein müssen. Als Korepressor von PTB könnte Raver1 auch an der Modulation weiterer, durch PTB regulierter Spleißprozesse beteiligt sein. Denkbar wäre beispielsweise eine kooperative Beteiligung am PTB-vermitteltem alternativen Spleißen von α -Actinin (Southby et al., 1999). α -Actinin bindet an Raver1 und seine RNA könnte in

Abhängigkeit von PTB und Raver1 gespleißt werden, wobei der molekulare Zusammenhang zwischen diesen beiden Prozessen unklar bleibt. In Raver1-defizienten Zelllinien und Geweben konnten jedoch keine Veränderungen im Expressionsgehalt der untersuchten Proteine, sowie in der Expressionsstärke der Isoformen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2.1). Diese Befunde decken sich mit RT-PCR-Analysen aus der Maus. Auch dort konnten keine Unterschiede der durch PTB regulierten Spleißvarianten von α -Tropomyosin und α -Actinin beobachtet werden (M. Fabienke, persönliche Mitteilung).

Die *in vitro* Daten, wonach Raver1 ein Korepressor des PTB-vermittelten Spleißens ist (Gromak et al., 2003) konnten somit *in vivo* nicht bestätigt werden. Analysen am neuronalen Spleißfaktor dem „neuro-oncological ventral antigen“ (Nova1) belegen allerdings, dass *in vitro*- und *in vivo*-Analysen nicht immer die selben Ergebnisse zeigen. Nova1 ist ein einzigartiger Spleißfaktor des Gehirns und an der Regulation des alternativen Spleißens verschiedener RNAs, unter anderem von Gephyrin und der Glycin- sowie GABA-Rezeptoruntereinheit beteiligt (Buckanovich et al., 1993). Der Verlust von Nova1 in der Maus führt dazu, dass die Nova1-defizienten Mäuse am Tag 10 nach der Geburt sterben (Buckanovich und Darnell, 1997, Jensen et al., 2000). Bei der vergleichenden Analyse von insgesamt 18 mRNAs, für die aufgrund von *in vitro* Versuchen ein Nova1 reguliertes Spleißen postuliert worden war, konnte nur für sieben Kandidaten eine dramatische Veränderung des Spleißmusters in Nova1-defizienten Tieren verzeichnet werden. Die Mehrheit der untersuchten mRNAs zeigte in der Nova1-Verlustmutante kein vom Wildtyp abweichendes Spleißmuster (Ule et al., 2003).

Das durch den Verlust von Raver1 keine Veränderungen in der Auswahl der alternativ gespleißten Exone von α -Tropomyosin nachgewiesen werden konnten, widerlegt daher nicht zwangsweise die postulierte Korepressorfunktion von Raver1. Im Gegensatz zu PTB und Nova1 wurde für Raver1 bisher keine eigenständige Spleißaktivität nachgewiesen (Gromak et al., 2003), so dass sich das Fehlen von Raver1 wahrscheinlich nur indirekt auf PTB-vermittelte Spleißprozesse auswirken kann. Der Verlust von Raver1 könnte somit zum einem von weiteren Modulatoren oder Korepressoren von PTB vollständig oder zumindest soweit kompensiert werden, dass eine Verschiebung im Spleißmuster von α -Tropomyosin nicht nachweisbar ist. Andererseits könnte *in vivo* α -Tropomyosin nicht das Gen, sondern andere durch Raver1-PTB-Komplexe reguliert werden. In jedem Fall müssten weitere Genprodukte, für die ein PTB-abhängiges Spleißen gezeigt wurde (siehe Kapitel 1.3), analysiert werden.

Die Assoziation mit Metavinculin/Vinculin, α -Actinin und Aktin weist Raver1 auch als ein Mikrofilament-assoziiertes Protein aus. Während der Differenzierung von Skelettmuskel verlässt Raver1 den Zellkern und lokalisiert in sarkomeren Strukturen, die aufgrund der Kolokalisation mit Vinculin als Costamere identifiziert wurden (Hüttelmaier et al., 2001). Neuere Studien

zeigen jedoch, dass Raver1 nicht nur in Costameren lokalisiert ist, sondern auch ein integraler Bestandteil des Sarkomers darstellt. So lokalisiert Raver1 in isolierten Myofibrillen in der I-Bande in unmittelbarer Nähe der Z-Linie (siehe Abbildung 3.02 und Dissertation A. Zieseniß, 2005). Für die sarkomere Struktur ist Raver1 vermutlich nicht essenziell, da Myofibrillen aus Raver1-defizienten Skelettmuskel der Maus keine groben strukturellen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Ebenso konnte in Skelettmuskelschnitten von Raver1-defizienten Mäusen keine strukturelle Abnormalität beobachtet werden (M. Fabienke, persönliche Mitteilung). Anhand der bisher durchgeführten Analysen wurde kein Hinweis auf eine primär strukturelle Funktion für Raver1 gefunden, allerdings wurden keine Kontraktionsmessungen durchgeführt. Andererseits stellt das Sarkomer keine statische Struktur da, sondern unterliegt vielmehr streng regulierten Prozessen in denen sich die Komponenten in einem Gleichgewicht aus koordinierter Proteinsynthese, Degradation, Zusammensetzung und Erhaltung befinden (Clark et al., 2002). Die ortsspezifische Verankerung und lokale Translation von mRNAs könnte hierbei eine wesentliche Rolle spielen. Eine solche spezifische mRNA-Lokalisation und Translation konnte bisher für die Strukturproteine Desmin, Vimentin und Vinculin in den Costameren embryonaler Muskulatur gezeigt werden (Morris und Fulton, 1994). Am gerichteten Transport von mRNAs sind unter anderem auch verschiedene hnRNPs beteiligt und auch für PTB wurde eine solche Beteiligung diskutiert (Krecic und Swanson, 1999). Auch Raver1 könnte direkt oder indirekt (über PTB) in diesen Vorgängen eingebunden sein und somit Einfluss auf die molekulare Architektur muskulärer Adhärenzverbindungen nehmen (Jockusch et al., 2003). Raver1 könnte auch als Adapterprotein für weitere Proteine dienen. Ein Beispiel für ein als Adapterprotein fungierendes Protein der I-Bande ist DRAL/FHL2, das metabolische Enzyme (Phosphofructokinase, Adenylatcyclase Kreatinkinase) im Sarkomer in Bereichen starken Energieverbrauchs verankert (Lange et al., 2002). Um eine Aussage über die Funktion von Raver1 in der Muskulatur zu treffen, müssten insbesondere Tests durchgeführt werden, die auch die Physiologie der Muskulatur sowie deren Aufbau und Dynamik untersuchen. Dies wären unter anderem Belastungstests mit anschließender Analyse des Muskelaufbaus nach Training oder Studien zur Regenerationsfähigkeit der Muskulatur nach Verletzung.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit bestand die Vorstellung, dass Raver1 vielleicht über seine eigenen RRM's oder im Komplex mit anderen hnRNPs mRNA bindet und gleichzeitig über Vinculin- α -Actinin-Aktin-Komplexe mit dem Cytoskelett assoziiert ist (Jockusch et al., 2003). Für Mitglieder der hnRNP-Familie (hnRNP K und hnRNP E1/E2) konnte eine transiente Assoziation mit cytoskelettalen Proteinen in „spreading initiation centers“ (SIC) beschrieben werden (de Hoog et al., 2004). Dies sind Ribonukleoprotein-Komplexe, die in einigen Zelllinien während der initialen Phase der Zelladhäsion gebildet werden. Da die SIC auch RNA enthalten,

die später in den ausgereiften Fokalkontakten nicht mehr vorhanden ist, kann angenommen werden, dass durch die hnRNPs eine lokale mRNA-Translation der für die Fokalkontakte benötigten Proteine stattfindet (de Hoog et al., 2004). Auch für Raver1 wurde eine mögliche Funktion während der initialen Ausbreitungsphase von Zellen untersucht. In Raver1-defizienten Zelllinien konnte jedoch kein Unterschied im Adhäsionsverhalten gegenüber den Wildtypzellen festgestellt werden. Allerdings konnte in Immunfluoreszenzanalysen weder eine generelle Ausbildung von SIC während der Anheftung und Ausbreitungsphase beobachtet werden, noch wurde Raver1 zu irgendeinem Zeitpunkt in cytoplasmatischen Strukturen von Fibroblasten oder Myoblasten gefunden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass offensichtlich nicht in allen Zelltypen SIC ausgebildet werden (de Hoog et al., 2004).

4.2 Raver2 weist Raver1-ähnliche Eigenschaften auf

Mögliche redundant wirkende Proteine könnten den Verlust von Raver1 in der Maus überdecken. Ein Beispiel für die funktionelle Redundanz von Proteinen stellen „Mammalian enabled“ (Mena) und „Vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP) dar. Beide Proteine sind in den meisten Zelltypen gemeinsam exprimiert, allerdings ist Mena stärker im Gehirn, VASP hingegen stärker in Blutblättchen exprimiert. Mena-defiziente Mäuse weisen keinen auffällig veränderten Phänotyp auf (Lanier et al., 1999). Ebenso konnte für VASP-defiziente Mäuse, bis auf eine reduzierte Blutblättchen-Aggregation, kein veränderter Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Aszodi et al., 1999, Hauser et al., 1999). Erst die Doppelverlustmutante von Mena/VASP zeigt einen gravierenden neuronalen Defekt und starke Missbildungen im Kopfbereich (Menzies et al., 2004).

Ein ähnliches Szenario wäre auch im Falle von Raver1 denkbar, sofern verwandte Proteine exprimiert werden, die eine ähnliche oder sogar identische zelluläre Funktion erfüllen. Es wurde daher in Gen-Datenbanken der Maus nach möglichen Raver1-homologen Proteinen gesucht. Hierbei konnte ein bisher unbekanntes Protein identifiziert werden, das aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie in den RRM's und einer Raver1-ähnlichen Domänenverteilung als Raver2 bezeichnet wurde. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten initialen biochemischen Charakterisierung konnten darüber hinaus weitere Gemeinsamkeiten beider Raver-Proteine aufgezeigt werden. In Tabelle 4.01 sind die bisher bekannten Charakteristika von Raver1 und Raver2 vergleichend dargestellt.

Tabelle 4.01: Vergleichende Darstellung von Raver1 und Raver2

Merkmal	Raver1	Raver2
Domänen	drei RRM zwei NLS eine leucinreiche Region ¹⁾	drei RRM zwei NLS eine leucinreiche Region ²⁾
Apparentes Molekulargewicht	80 kDa ¹⁾	72 kDa ²⁾
Expression	ubiquitär ¹⁾	embryonal/neuronal ^{2), 3)}
Lokalisation	nukleär/cytoplasmatisch ¹⁾ hoch konzentriert in den PNC kolokalisiert dort mit PTB ¹⁾	nukleär ²⁾ hoch konzentriert in den PNC kolokalisiert dort mit PTB ²⁾
Pendelaktivität	pendelt zwischen Zellkern und Cytoplasma ¹⁾	pendelt zwischen Zellkern und Cytoplasma ²⁾
Liganden	PTB ¹⁾ Metavinculin/Vinculin ¹⁾ α -Actinin ¹⁾ Aktin ⁴⁾	PTB ²⁾
Bindungsregion von Raver für PTB	zentral, außerhalb der RRM Aminosäuren 307-401 ⁵⁾	zentral ²⁾ Aminosäuren 244-493 ⁶⁾
Bindungsregion von PTB für Raver	N-terminal (RRM1 und RRM2) Aminosäuren 1-335 ²⁾	N-terminal (RRM1 und RRM2) Aminosäuren 1-335 ²⁾
Selbstassoziation	C-terminal ⁴⁾	über RRM2 initiiert ⁶⁾
RNA-Bindung	keine eigenständige RNA- Bindung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> ²⁾	keine eigenständige RNA- Bindung <i>in vitro</i> ²⁾

¹⁾Hüttelmaier et al., 2001,²⁾diese Arbeit, teilweise publiziert in 3),³⁾Kleinhenz et al., 2005,⁴⁾Dissertation A. Zieseniß, 2005,⁵⁾Gromak et al., 2003,⁶⁾Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005.

Beide Raver-Proteine sind vornehmlich im Zellkern lokalisiert. Dies gilt sowohl für die endogenen Proteine in Ratten-Neuronen und -Glia-Zellen, die jeweils beide Proteine exprimieren, als auch für exogenen Raver1 und Raver2 nach Transfektion nicht-neuronaler Zelllinien. In Heterokaryon-Analysen können beide Raver-Proteine zwischen Zellkern und Cytoplasma pendeln, wobei die RRM für diese Translokation nicht notwendig sind. Vielmehr deuten bisherige Untersuchungen darauf hin, dass die Translokation über die C-terminale NLS und den leucinreichen Bereich vermittelt wird. Im Zellkern akkumulieren beide Raver-Proteine

in den „perinucleolar compartments“ (PNCs). Wie Raver1 kolokalisiert dort auch Raver2 mit PTB. Die PNCs stellen dynamische Strukturen an der Peripherie des Nukleolus dar, die besonders in transformierten Zelllinien auftreten und in denen die Lokalisation von hnRNPs beschrieben wurde (Huang et al., 1998). Der Nachweis von Raver2 und PTB in gemeinsamen zellulären Komplexen erfolgte durch eine Immunpräzipitation. Im Gegensatz zu den *in vitro* Untersuchungen kann die Interaktion von Raver2 mit PTB in Zellen nicht auf die PTB-Isoform 1 beschränkt werden, da der verwendete PTB-Antikörper an alle drei PTB-Isoformen bindet. Raver2 liegt somit in der Zelle nicht nur in Komplexen mit PTB1 sondern auch mit den beiden größeren PTB-Isoformen (PTB2 und PTB4) vor.

Nicht vollständig aufgeklärt sind bisher mögliche Unterschiede in den Interaktionsbereichen von Raver1 und Raver2 an PTB1. In der Erstbeschreibung für Raver1 konnte ein N-terminales Fragment identifiziert werden (Aminosäuren 1-441), welches für die Bindung an PTB essenziell ist (Hüttelmaier et al., 2001). In „Pulldown“-Experimenten konnte der Interaktionsbereich weiter auf die Aminosäuren 307-401 eingegrenzt werden (Gromak et al., 2003). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass eventuell zwei Bindungsbereiche existieren, im N-terminalen aber auch im C-terminalen Bereich von Raver1 (C.W. Smith unveröffentlichte Daten, zitiert in Spellman et al., 2005). Für Raver2 konnte der Interaktionsbereich mit PTB auf eine leucinreiche Region außerhalb der RRMs eingegrenzt werden (Aminosäuren 244-493, Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005). Dies entspricht dem N-terminalen Interaktionsbereich von Raver1 für PTB. Im Gegensatz zu Raver1 konnten jedoch bisher keine weiteren Interaktionsbereiche für Raver2 identifiziert werden.

Die Bindungsregion von PTB1 an die Raver-Proteine konnte in der vorliegenden Arbeit über PTB-Deletionskonstrukte bestimmt werden. Raver1 und Raver2 binden jeweils an ein PTB-Deletionskonstrukt, das noch die RRM1 und RRM2 beinhaltet. Der RRM2 wird die Funktion der Selbsssoziation zugeschrieben (Oh et al., 1998). Ob durch Bindung von Raver1 oder Raver2 in dieser Region von PTB dessen Dimerisierung oder Oligomerisierung beeinflusst wird ist unbekannt. Für die RRM1 von PTB wurde postuliert, dass sie die Bindung von bisher unbekannten Kofaktoren vermittelt (Oh et al., 1998). Raver1 und Raver2 könnten solche Kofaktoren darstellen, wobei zu überprüfen bleibt, ob sie ausschließlich an RRM1 binden. Auch über den molekularen Aufbau von PTB-Raver-Komplexen kann bisher nur spekuliert werden. Für PTB wurde gezeigt, dass es zur Selbstassoziation fähig ist, und es wurde postuliert, dass es in dimerer Form in der Zelle vorliegt (Oh et al., 1998). Für die beiden Raver-Proteine gibt es bisher *in vitro* Befunde, die ebenfalls auf eine Homodimerisierung schließen lassen (siehe Tabelle 4.01). Eine Heterodimerbildung zwischen beiden Raver-Proteinen konnte bisher jedoch nicht beobachtet werden. Aufgrund dieser Befunde ist eine direkte Interaktion beider Raver-

Proteine eher unwahrscheinlich. Durch eine Selbstassoziation aller drei Proteine könnten aber multimere Proteinkomplexe gebildet werden, die gleichzeitig beide Raver-Proteine enthalten.

Raver1 ist ubiquitär in allen Geweben und untersuchten Zelllinien exprimiert, wohingegen Raver2 vorwiegend neuronal und während der Embryoentwicklung exprimiert ist. Da auch der Verlust von Raver1 zu keiner erhöhten oder ektopischen Expression von Raver2 führt (M. Fabienke, persönliche Mitteilung) kann das Fehlen eines auffälligen Phänotyps in den Raver1-defizienten Mäusen nicht durch die Präsenz von Raver2 erklärt werden.

Das restriktive Expressionsmuster von Raver2 deutet eher auf eine auf spezielle Zelltypen (Neuronen, Glia-Zellen) beschränkte Funktion hin, z. B. während neuronaler Differenzierungsprozesse. In diesem Zusammenhang ist jedoch erstaunlich, dass in neuronalen Zelllinien selbst nach Differenzierung keine Raver2-Expression nachweisbar ist. Es ist allerdings auch denkbar, dass die morphologische Differenzierung neuronaler Zellen und Zelllinien unabhängig von Raver2 erfolgt. Wie auch für Raver1 ist daher eine strukturelle Funktion für Raver2 unwahrscheinlich. Raver2 könnte eher in spätere Prozesse der Differenzierung involviert sein, die im vorliegenden Fall nicht erreicht wurden (z. B. Ausbildung von Synapsen). Hier sind weiterführende Experimente notwendig, in denen beispielsweise die Expression von Raver2 in Neuronen mit deren Erregungsleitung korreliert wird.

Bisher sind keine cytoplasmatischen Liganden von Raver2 bekannt. Erste Analysen zeigen, dass Raver2 nicht mit Vinculin oder Metavinculin interagiert (Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005). Eine Assoziation von Raver2 mit myofibrillären Strukturen während der Myogenese, wie für Raver1 beschrieben (Hüttelmaier et al., 2001), konnte für Raver2 bisher nicht beobachtet werden. Auch diese Aspekte müssen in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.3 Raver1 und Raver2 – hnRNPs ohne RNA-Bindung?

Bei RNA-bindenden Proteinen stellen die RRM's das am häufigsten auftretende RNA-Bindungsmotiv dar. Beim Menschen sind 497 Proteine bekannt, die dieses charakteristische Motiv enthalten. Dies bedeutet, dass 2% der humanen Gene für eine RRM kodieren (Maris et al., 2005). Die Funktion der RRM's der Raver-Proteine als RNA-Bindungsmotive wurde erstmals in der hier vorliegenden Arbeit systematisch untersucht.

Es wurden beide Raver-Proteine *in vitro* und Raver1 auch *in vivo* auf eine RNA-Bindung hin untersucht. Für die *in vitro* Studien (Protein-RNA UV-, „Crosslink“ und Ribohomopolymer-Bindungstest) wurden rekombinante Proteine eingesetzt, die aus Insektenzellen (Raver1) oder *E. coli* (Raver2) isoliert worden waren. Als Positivkontrollen dienten die bakteriell exprimierten

Proteine, PTB1 und hnRNP C2. Die *in vivo* Analysen (CLIP) konnten nur für Raver1 durchgeführt werden, da keine Raver2-exprimierenden Zelllinien zur Verfügung standen und mit dem Antikörper 4C8 kein endogenes Raver2-Protein aus Gehirngewebe präzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). In keiner der genannten Analysen konnte eine spezifische Assoziation von Raver1 oder Raver2 mit RNA nachgewiesen werden, während die eingesetzten Positivkontrollen die erwarteten Interaktionen aufwiesen. Sogar der Ribohomopolymer-Bindungstest, ein klassischer Versuch zum generellen Nachweis von Protein-RNA-Interaktionen, war negativ.

Im Protein-RNA UV-„Crosslink“ waren für Raver1 schwache Signale nachweisbar, die jedoch im Vergleich zu den Positivkontrollen PTB1 und hnRNP C2 und den Negativkontrollen MVT und Raver1-ΔN als falschpositiv eingeschätzt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der hohe pI von Raver1 geben. Mit einem pI von 8,73 ist Raver1 deutlich basischer als Raver2 (pI von 6,74). Dies könnte erklären, warum das rekombinante Raver2-Protein keine falschpositive Interaktion mit der RNA aufweist. Auch der C-terminale Bereich von Raver1 ist mit einem pI von 10,26 extrem basisch und begünstigt somit eine auf unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende falschpositive RNA-Bindung. In Untersuchungen an murinen Zellkulturen (C2C12-Zellen) konnte für Raver1 auch *in vivo* keine RNA-Bindung gezeigt werden. Ein Nachweis der PTB-RNA-Interaktion in diesen Zellen war aufgrund der Speziesspezifität des PTB-Antikörpers nicht möglich. Eine identische Analyse mit HeLa-Zellen zeigte jedoch die Bildung von PTB-RNA-Komplexen, so dass das negative Ergebnis für Raver1 vermutlich nicht auf einem experimentellen Fehler beruht.

Um diese negativen Ergebnisse zu erklären, sind zwei Szenarien denkbar. Zum einem könnten die Raver-Proteine nur in einem bestimmten zellulären Kontext in der Lage sein, RNA zu binden. Dies erfordert gegebenenfalls eine Modifikation der Raver-Proteine oder spezifische Interaktionen mit zellulären Faktoren. Es ist denkbar, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen diese Kriterien nicht erfüllt waren. Zum anderen könnten die Raver-Proteine tatsächlich trotz ihrer RRM RNA nicht direkt binden. Sie wären dann nicht wie PTB und verwandte Proteine trans-aktive Faktoren, die direkt an cis-regulatorische Elemente der RNA binden, sondern eher als „trans-trans“ Faktoren zu sehen, die möglicherweise über Protein-Protein-Wechselwirkungen auf RNA-assoziierte Prozesse Einfluss nehmen.

Darüber hinaus kann jedoch auch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die experimentellen Ansätze nicht geeignet waren, um eine Raver-RNA-Bindung zu zeigen. Zum einem könnten die hier verwendeten rekombinanten Raver-Proteine dafür ungeeignet sein. So wurde rekombinanter Raver1 aus Insektenzellen und Raver2 aus *E. coli* verwendet. Beide Proteine sind in ihrer Expression und Aufreinigung problematisch und unterliegen bereits während der Expression

einem starken Abbau (Dissertation A. Zieseniß, 2005, Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005). Sollten spezifische posttranslationale Modifikationen für eine RNA-Bindung der Raver-Proteine erforderlich sein, ist ein prokaryontisches Expressionssystem, wie hier für Raver2 verwendet, generell ungeeignet. Doch auch in einem eukaryontischen Expressionssystem ist nicht gewährleistet, dass posttranslationale Modifikationen korrekt erfolgen. Es ist daher denkbar, dass weder bakteriell exprimiertes Raver2-Protein noch aus Insektenzellen isolierter Raver1 die erforderlichen Modifikationen aufweisen. Fehlende Modifikationen könnten auch die negativen Ergebnisse des Nachweises der Raver1-RNA-Bindung *in vivo* erklären. So ist beispielsweise denkbar, dass die RRM von Raver1 nur in sich differenzierenden Myoblasten mit RNA assoziieren, nicht aber mit proliferierenden Kulturen von C2C12-Zellen.

Sollten Raver-Proteine jedoch tatsächlich nicht die Fähigkeit besitzen, direkt RNA zu binden, stellt sich die Frage, welche Funktion ihre RRM dann haben? Neueste Untersuchungen zeigen, dass RRM auch wichtige Funktionen bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen übernehmen. Dabei sind folgende Prozesse denkbar: die Assoziation wird über zwei miteinander interagierende RRM vermittelt, oder die RRM eines Proteins kann mit anderen Bereichen eines weiteren (RNA-bindenden) Proteins wechselwirken (Maris et al., 2005, Stefl und Allain, 2005). Durch solche Interaktionen ist jedoch nicht zwangsläufig die RNA-Bindung der RRM beeinträchtigt. Vielmehr gibt es RRM-beinhaltenen Proteine, die nur in Gegenwart eines Kofaktors mit RNA assoziiert sind (Maris et al., 2005).

Die Aufklärung der Feinstruktur von RRM auf atomarer Ebene zeigt, dass es auch Proteine gibt, deren RRM vorwiegend in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind und nicht in Protein-RNA-Interaktionen. Y14 und Magoh sind zwei Proteine des „exon-exon junction complex“ (EJC) in Vertebraten, die stabile Komplexe miteinander bilden (Lau et al., 2003). Der EJC ist ein Komplex aus mehreren Proteinen, der nach dem Spleißen der prä-mRNA gebildet wird und für den Export von mRNAs aus dem Zellkern wichtig ist (Dreyfuss et al., 2002). Magoh ist das Vertebraten-Homologe zu dem Protein *mago nashi* aus *Drosophila melanogaster*. Sein Partner Y14 enthält im C-terminalen Bereich eine typische RRM mit RNP-1 und RNP-2 Motiv. In Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass das RNP-2 Motiv von Y14 nicht an RNA bindet, sondern für die Komplexbildung mit Magoh verwendet wird (Fribourg et al., 2003, Lau et al., 2003). *In vitro* konnte jedoch eine direkte Assoziation von Y14 mit RNA nachgewiesen werden. Daher wurde postuliert, dass die RNA-Bindung von Y14 unabhängig von der RRM erfolgt (Fribourg et al., 2003). In *in vivo* Spleißanalysen konnte gezeigt werden, dass Y14 sowie auch Magoh mit gespleißter RNA in einem Komplex vorliegen (Kim et al., 2001). Der Y14-Magoh-Komplex bindet dabei eigenständig keine RNA, erst die Interaktion mit weiteren Mitgliedern des EJC ermöglicht die Komplexierung mit RNA (Fribourg et al., 2003, Kim et al., 2001). Der

molekulare Schalter, der eine RRM dazu veranlasst, nicht RNA sondern Protein zu binden, ist noch nicht bekannt (Chen und Varani, 2005).

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass RRM-s nicht zwangsweise eine Bindung an RNA vermitteln und nicht jedes potenzielle RNA-bindende Protein auch tatsächlich direkt mit RNA assoziiert sein muss. Die molekulare Vielfalt und Komplexität RNA-assoziierter Multiproteinkomplexe sprechen vielmehr dafür, dass die RNA-Bindung weniger Komponenten innerhalb dieser Komplexe durch eine Vielzahl assoziierter Proteine reguliert wird.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass weder für Raver1 noch für Raver2 eine RNA-Bindung gezeigt werden konnte. Die Raver-Proteine könnten aber durchaus Bestandteil RNA-assoziierter Komplexe sein, ohne direkt an RNA zu binden. Ebenfalls ist es denkbar, dass die RRM-s der Raver-Proteine an der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind.

4.4 Raver1 und Raver2 als mögliche Modulatoren der PTB-RNA-Bindung

Im Ribohomopolymer-Bindungstest konnte gezeigt werden, dass PTB1 gleichzeitig mit Raver1 oder Raver2 und RNA interagieren kann. Dieser Versuch lässt jedoch keine Rückschlüsse zu, ob durch die Komplexbildung mit PTB1 auch die Raver-Proteine direkt mit RNA assoziieren können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht zu unterscheiden, ob die RNA-Bindung über PTB1 oder die Raver-Proteine vermittelt wird. Im Far-Western konnte die Assoziation der Raver-Proteine mit den ersten beiden RRM-s von PTB1 (PTB1-RRM12) gezeigt werden. Die PTB1-Deletionskonstrukte (PTB1-RRM12 und PTB1-RRM34, vergleiche Abbildung 3.26) zeigen eine schwächere Bindung an Polynukelotide, so dass keine Kopräzipitation der Raver-Proteine erkennbar war (Daten nicht gezeigt). Diese schwächere RNA-Bindung konnte ebenfalls in Protein-RNA UV-„Crosslink“-Experimenten bestätigt werden und deckt sich mit früheren Daten, nach denen PTB-Fragmente im Vergleich zum Gesamtprotein eine deutlich schlechtere Bindung an RNAs zeigen (Oh et al., 1998, Perez et al., 1997a). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Raver-Proteine über PTB an die RNA rekrutiert werden.

In UV-„Crosslink“-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die PTB1-RNA-Bindung durch steigende Konzentrationen von rekombinantem Raver1 oder Raver2 verstärkt wird. Anhand dieser Experimente kann jedoch nicht entschieden werden, ob die Affinität für dieselben RNAs steigt oder ob sich durch die Komplexbildung mit den Raver-Proteinen das Repertoire der gebundenen RNAs verändert. Im Vergleich der „Western Blot“-Analysen und der Autoradiographie konnte in allen Versuchen festgestellt werden, dass nur ein kleiner Anteil des

Proteins mit RNA assoziiert war. Dieser Anteil ließ sich nicht durch Modulationen in der eingesetzten RNA-Menge oder PTB1 im gleichen Maße verändern, wie durch Zugabe von Raver-Proteinen. Möglicherweise wird durch die Komplexbildung die RNA-Bindung erleichtert oder die PTB1-RNA-Komplexe werden durch die Anwesenheit der Raver-Proteine stabilisiert. Desweiteren könnte PTB durch die Bindung an eines der Raver-Proteine eine Konformationsänderung vollziehen, wodurch PTB eine höhere Affinität zur RNA erhält.

Während für Raver2 auch in Anwesenheit von PTB1 keine Assoziation mit RNA nachgewiesen wurde, konnte für Raver1 in Anwesenheit von PTB1 eine Assoziation mit RNA gezeigt werden. Diese Signale sind nicht primär auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen, da sie nur in Anwesenheit von PTB1 auftreten (siehe Abbildung 3.36 und 3.37). Die RNA-Assoziation von Raver1 könnte in einem direkten Zusammenhang mit der Komplexbildung mit PTB1 stehen. PTB1 bindet direkt an RNA und könnte durch die simultane Interaktion mit Raver1 diesen in räumliche Nähe zur RNA bringen. Die für das C-terminale Raver1-Fragment (Raver1- Δ N) beobachtete falschpositive Interaktion mit RNA lässt vermuten, dass tatsächlich durch den starken basischen Charakter von Raver1 elektrostatische Wechselwirkungen mit RNA begünstigt werden. Dies entspricht jedoch nicht einer spezifischen durch die RRM's vermittelten RNA-Bindung. Somit wäre auch die beobachtete RNA-Assoziation von Raver1 als unspezifisch einzustufen. Ob nur die RRM's sowohl von Raver1 als auch von Raver2 eine RNA-Bindung eingehen können, konnte nicht untersucht werden, da diese Proteinkonstrukte instabil sind und weder im prokaryontischen noch im eukaryontischen Expressionssystem exprimiert und aufgereinigt werden können (Daten nicht gezeigt).

Für die RRM1 von PTB wurde bereits 1998 die Bindung eines Kofaktors postuliert, der die RNA-Bindungsaffinität von PTB verstärkt (Oh et al., 1998). Es konnte in UV-„Crosslink“-Experimenten gezeigt werden, dass die RNA-Bindung eines Deletionskonstrukts von PTB, das nur RRM1 und RRM2 besitzt, durch HeLa-Zellextrakte verstärkt wird. Ein darin enthaltener Kofaktor könnte zum einen die PTB-RNA-Interaktion ähnlich wie ein Enzym katalysieren, in dem er an PTB und die RNA gleichzeitig bindet, oder eine Konformationsänderung bewirken, die zur Verstärkung der PTB-RNA-Interaktion führt (Oh et al., 1998). In diesem postulierten Modell könnten Raver1 sowie Raver2 die Funktionen des unbekannten Kofaktors übernehmen.

In Ribohomopolymer-Bindungstests wurde gezeigt, dass RNA-PTB-Raver-Komplexe entstehen können. Nach den Daten der *in vitro* Protein-RNA UV-„Crosslinks“ kann die Bindung von PTB an die RNA prinzipiell Raver-unabhängig erfolgen. Aus diesen Aussagen lassen sich verschiedene Modelle ableiten. In einem ersten Modell (siehe Abbildung 4.01 A) könnten Raver-Proteine über PTB an die RNA rekrutiert werden. Alternativ könnten sich erst PTB-Raver-Komplexe bilden, die anschließend über PTB an die polypyrimidinreichen Sequenzen der RNA

binden (siehe Abbildung 4.01 B). Welches dieser beiden Modelle zutrifft kann anhand der bisherigen Daten nicht entschieden werden. Es wäre durchaus denkbar, dass beide Varianten auftreten.

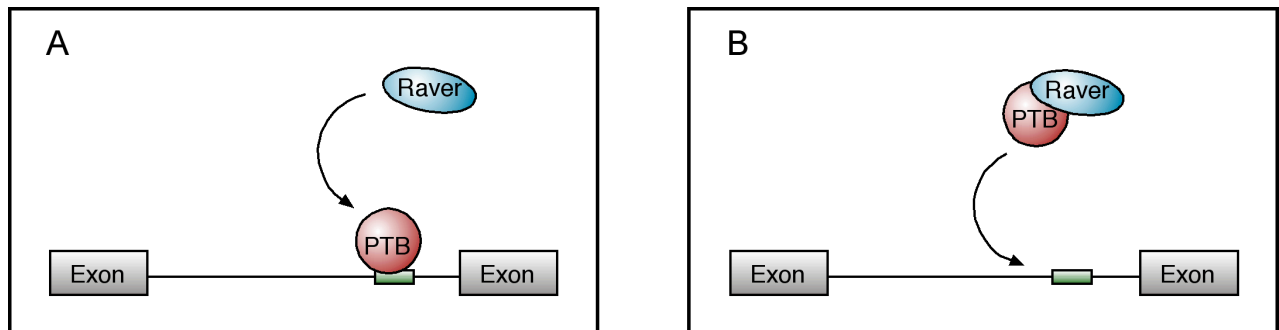


Abbildung 4.01: Modellvorstellung zur prinzipiellen Raver-PTB-RNA-Bindung. In den beiden Modellen ist schematisch die prä-mRNA mit zwei Exonen und dem dazwischen liegenden Intron dargestellt. Die polypyrimidinreichen Sequenzen sind als grüne Box markiert und stellen den Bindungsbereich von PTB an die RNA dar. In A wird durch die PTB-RNA-Bindung Raver zur RNA rekrutiert und in B werden Raver-PTB-Komplexe an die RNA rekrutiert. Die Proteine sind mit Namen gekennzeichnet, wobei Raver in blau und PTB in rot abgebildet ist.

In beiden Fällen kommt es zu einer verstärkten Assoziation von PTB mit RNA. Es bleibt zu untersuchen, ob durch die Bindung von PTB mit den Raver-Proteinen die generelle Affinität von PTB für die RNA erhöht wird, oder ob durch die Raver-Proteine PTB-RNA-Komplexe lediglich stabilisiert werden. Aus den vergleichenden *in vitro* Analysen (Präinkubation / keine Präinkubation) muss aber derzeit geschlossen werden, dass eine vorzeitige Bindung von PTB und den Raver-Proteinen nicht erforderlich ist.

Die durch Raver1 oder Raver2 vermittelte Verstärkung der PTB-RNA-Interaktion harmoniert mit der bisher angenommenen Funktion von Raver1 als Korepressor des PTB-vermittelten Spleißens. Wie Raver1 am Ort des Spleißens mit PTB zusammen wirken könnte, ist in dem folgenden Modell dargestellt (siehe Abbildung 4.02). Diese Modellvorstellung basiert auf verschiedenen, für die Regulation des durch PTB-vermittelten alternativen Spleißens postulierten Vorgänge (Chou et al., 2000, Wagner et al., 2001, Dredge et al., 2001, Gromak et al., 2003). In dem hier abgebildeten Modell ist jedoch jeweils nur das durch PTB reprimierte Exon dargestellt. Eine mögliche Selektion alternativer Exone (wie z. B. für α -Tropomyosin beschrieben) bleibt hierbei unberücksichtigt.

Zur Assemblierung des Spleißosoms und zur Durchführung des Spleißens werden einige essenzielle Spleißfaktoren benötigt. Zunächst findet eine Bindung von U1 snRNP, das ist ein Komplex aus kleinen uridinreichen RNAs (sn RNAs) und Proteinen, an die Nukleotide der

5'-Introngrenze statt. Des weiteren bindet U2AF, ein Hilfsfaktor von U2 snRNP, an polypyrimidinreiche Sequenzen nahe des „Branchpoints“ und bewirkt dadurch die Rekrutierung von U2 snRNP an den „Branchpoint“ (siehe Abbildung 4.02. A). Durch Rekrutierung weiterer Spleißfaktoren wird schließlich die intronische Schleife (Lariat) gebildet, das Intron herausgeschnitten und die Exone werden miteinander ligiert.

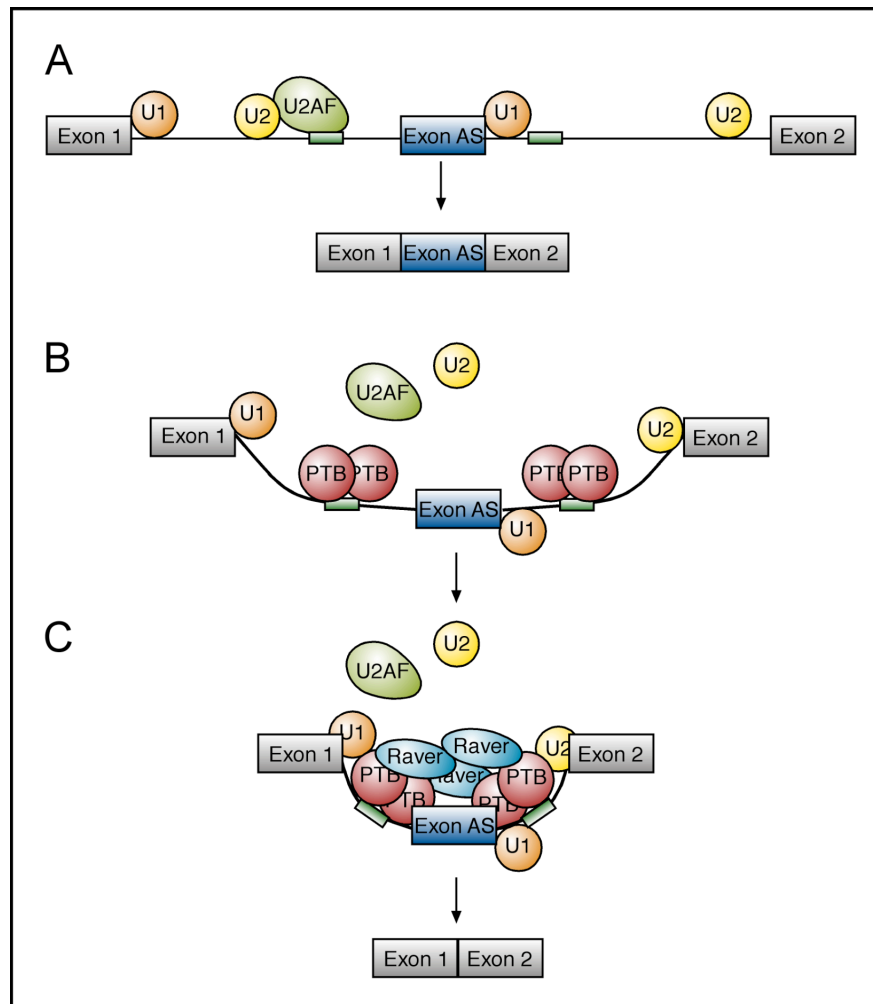


Abbildung 4.02: Modellvorstellung zur Modulation des PTB-vermittelten Spleißens durch Raver.

In dem Modell ist die prä-mRNA mit drei Exonen (Exon AS; alternativ gespleißtes Exon) dargestellt. Als schwarze Line sind die Introns dargestellt, wobei als grüne Box die cis-aktiven polypyrimidinreichen Sequenzen, die das Exon AS flankieren eingezeichnet sind. In A ist die initiale Konfiguration des Spleißosoms dargestellt, wobei U1 snRNP (U1) an die 5'-Introngrenze bindet. U2 snRNP (U2) bindet an den „Branchpoint“ und wird durch den U2 snRNP Hilfsfaktor (U2AF), welcher an die polypyrimidinreichen Sequenzen bindet, rekrutiert. In B ist die Bindung von PTB-Dimeren an die polypyrimidinreichen Sequenzen und die damit verbundene Verdrängung von U2AF dargestellt. Eine mögliche Position der Raver-Proteine in dem PTB-vermittelten Spleiß ist in C dargestellt, wobei Multiprotein-Komplexe an der prä-mRNA entstehen könnten. Die Proteine sind unterschiedlich farbig dargestellt und mit Namen bezeichnet. Modifiziert nach Chou et al., 2000, Dredge et al., 2001 und Wagner et al., 2001.

Die Inkorporation eines alternativ gespleißten Exons wird über „Enhancer“ oder Repressoren reguliert, die die Bildung des Spleißosoms begünstigen oder verhindern. PTB stellt solch einen Repressor dar, es konkurriert mit U2AF um die Bindung an die polypyrimidinreichen Sequenzen die in Nachbarschaft des „Branchpoints“ liegen (siehe Abbildung 4.02 B). Durch die Bindung von PTB an diese Sequenzen kann U2AF nicht mehr binden und somit nicht U2 snRNP rekrutieren. Dies führt zur Blockierung der Ansammlung des Spleißosoms an dieser Stelle (Chou et al., 2000, Dredge et al., 2001). Es findet somit eine durch PTB-vermittelte Inhibierung des Spleißens statt. PTB liegt in Lösung als Dimer vor (Perez et al., 1997a) und könnte als solches an polypyrimidinreiche Sequenzen binden.

Es bestehen mehrere Möglichkeiten, wie die Raver-Proteine die PTB-vermittelte Repression verstärken könnten. So könnte die Assoziation von Raver und PTB in möglicherweise multimeren Proteinkomplexen nicht nur die Bindung von PTB an RNA verstärken oder stabilisieren, sondern darüber hinaus auch die Sekundärstruktur der RNA dahingehend verändern, dass das Überspringen des alternativ gespleißten Exons begünstigt wird (siehe Abbildung 4.02 C).

Darüber hinaus könnte Raver1 auch selbst die Rekrutierung von Spleißfaktoren behindern, indem Bindungsstellen durch das Protein verdeckt werden. Andererseits wäre über Raver1 auch die Bindung weiterer Repressorproteine denkbar. In jedem Fall könnten so Raver-Proteine PTB-vermittelte Spleißprozesse modulieren ohne selbst eine spezifische RNA-Bindung aufzuweisen. Raver1 und Raver2 wären somit „trans-trans“ wirkenden Faktoren, da sie nicht direkt auf die cis-aktiven Elemente der RNA wirken, sondern einen an diese Sequenzen bindenden trans-aktiven Faktor (PTB) modulieren. Aufgrund ihrer ähnlichen biochemischen Eigenschaften könnten sowohl Raver1 (wie durch Gromak et al., 2003 postuliert) als auch Raver2 als Korepressoren von PTB fungieren.

4.5 Ausblick

Die Identifizierung von Raver2 als ein Raver1 homologes Protein, sowie die Entdeckung der Modulation der PTB-RNA-Bindung durch Raver1 oder Raver2, eröffnen eine Vielzahl neuer Ansatzpunkte für weitere Analysen. Um jedoch Indizien dafür zu erhalten, ob Raver1 und Raver2 prinzipiell *in vivo* mit PTB und RNA assoziiert sind, wäre es interessant sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Spleißanalysen zur Identifizierung von Komplexen in denen die Raver-Proteinen mit prä-mRNA oder mRNA assoziiert sind, durchzuführen. Außerdem sollte geklärt werden, welche Funktion die Verstärkung der PTB-RNA-Bindung hat, die durch die Anwesenheit der

Raver-Proteine entsteht. Es ist ebenfalls unklar, ob Raver1 durch die Bindung an PTB die Fähigkeit zu einer eigenständigen spezifischen RNA-Bindung erlangt. Hierzu wäre es interessant, die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Protein-RNA-Bindung auf verschiedene Gewebe und Differenzierungsstadien auszudehnen.

Ein im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelter Aspekt, der jedoch für die Aufklärung einer möglichen Funktion von Raver1 und Raver2 interessant sein könnte, ist die Bedeutung der Raver1-Aktin Interaktion, die biochemisch bereits gut charakterisiert ist (Dissertation A. Zieseniß, 2005). Für Raver2 zeigen ersten biochemische Analysen ebenfalls eine Interaktion mit Aktin (Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005). Damit besteht die Möglichkeit, dass die Raver-Proteine über die Aktin-Bindung im Komplex mit anderen Proteinen am cytoplasmatischen Transport von mRNA beteiligt sind. Beispielsweise konnte so eine spezifische Lokalisation der β -Aktin mRNA an die Zellperipherie, als Voraussetzung für lokale Translation gezeigt werden (Lawrence und Singer, 1986, Hüttelmaier et al., 2005). Der spezifische Transport der β -Aktin mRNA findet entlang des Mikrofilamentsystems statt und wird von cytoplasmatischen RNP-Komplexen vermittelt (Shav-Tal und Singer, 2005). Für die Raver-Proteine wäre es vorstellbar, dass sie ebenfalls in diesen RNP-Komplexen lokalisieren und am spezifischen Transport oder der Translationskontrolle von mRNAs beteiligt sind.

Raver1 und Raver2 könnten auch in Aktin-vermittelten Kernprozessen eine Rolle spielen. Für kernständiges Aktin konnte bereits eine Beteiligung an Transkriptionsprozessen und am mRNA-Export gezeigt werden (Bettinger et al., 2004). Außerdem wurde für Kernaktin eine direkte Interaktion mit Vertretern der hnRNP-Familie, wie z.B. hrp36 nachgewiesen (Percipalle et al., 2001). Kürzlich wurde auch für hnRNP U, ein weiteres Mitglied der hnRNP-Familie, eine funktionelle Assoziation mit Aktin im Zellkern gezeigt werden (Kukalev et al., 2005). Somit wäre durch die Assoziation mit Aktin auch für Raver1 sowie Raver2 eine Beteiligung an Transkriptionsprozessen denkbar.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Akamatsu, W., Okano, H.J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R.B. and Okano, H. 1999. Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9885-90.

Antic, D. and Keene, J.D. 1998. Messenger ribonucleoprotein complexes containing human ELAV proteins: interactions with cytoskeleton and translational apparatus. *J Cell Sci*. 111:183-97.

Ashiya, M. and Grabowski, P.J. 1997. A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *RNA*. 3:996-1015.

Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X.H., Ny, L., Andersson, K.E., Kehrel, B., Offermanns, S. and Fassler, R. 1999. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J*. 18:37-48.

Beggs, A.H., Byers, T.J., Knoll, J.H., Boyce, F.M., Bruns, G.A. and Kunkel, L.M. 1992. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem*. 267:9281-8.

Bendori, R., Salomon, D. and Geiger, B. 1989. Identification of two distinct functional domains on vinculin involved in its association with focal contacts. *J Cell Biol*. 108:2383-93.

Bettinger, B.T., Gilbert, D.M. and Amberg, D.C. 2004. Actin up in the nucleus. *Nature , Mol Cell Biol*. 5:410-15.

Birnboim, H.C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7:1513-23.

Blau, H.M., Pavlath, G.K., Hardeman, E.C., Chiu, C.P., Silberstein, L., Webster, S.G., Miller, S.C. and Webster, C. 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230:758-66.

Bomsztyk, K., Denisenko, O. and Ostrowski, J. 2004. hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays*. 26:629-38.

Borman, A., Howell, M.T., Patton, J.G. and Jackson, R.J. 1993. The involvement of a spliceosome component in internal initiation of human rhinovirus RNA translation. *J Gen Virol.* 74:1775-88.

Boyd, J., Risinger, J.I., Wiseman, R.W., Merrick, B.A., Selkirk, J.K. and Barrett, J.C. 1995. Regulation of microfilament organization and anchorage-independent growth by tropomyosin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:11534-8.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Buckanovich, R.J. and Darnell, R.B. 1997. The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol.* 17:3194-201.

Buckanovich, R.J., Posner, J.B. and Darnell, R.B. 1993. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron.* 11:657-72.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. 1987. From genes to clones: An introduction to gene technology. *Weinheim: VCH.*

Burd, C.G. and Dreyfuss, G. 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science.* 265:615-21.

Carstens, R.P., Wagner, E.J. and Garcia-Blanco, M.A. 2000. An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol.* 20:7388-400.

Cashman, N.R., Durham, H.D., Blusztajn, J.K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I.T., Dahrouge, S. and Antel, J.P. 1992. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn.* 194:209-21.

Chan, R.C. and Black, D.L. 1997. The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell-specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream. *Mol Cell Biol.* 17:4667-76

Chen, Y. and Varani, G. 2005. Protein families and RNA recognition. *FEBS J.* 272:2088-97.

- Chou, M.Y., Underwood, J.G., Nikolic, J., Luu, M.H. and Black, D.L. 2000. Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol Cell*. 5:949-57.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. and Gregorio, C.C. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:637-706.
- Clark, T.G. and Merriam, R.W. 1977. Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell*. 12:883-91.
- Cote, C.A., Gautreau, D., Denegre, J.M., Kress, T.L., Terry, N.A. and Mowry, K.L. 1999. A *Xenopus* protein related to hnRNPI has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell*. 4:431-7.
- de Hoog, C.L., Foster, L.J. and Mann, M. 2004. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell*. 117:649-62.
- Dempsey, L.A., Sun, H., Hanakahi, L.A. and Maizels, N. 1999. G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *J Biol Chem*. 274:1066-71.
- Deryckere, F. and Gannon, F. 1994. A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques*. 16:405-9.
- Dredge, B.K., Polydorides, A.D. and Darnell, R.B. 2001. The splice of life: alternative splicing and neurological disease. *Nat Rev Neurosci*. 2:43-50.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. and Burd, C.G. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*. 62:289-321.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, V.N. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:195-205.
- Falley, K. und Illenberger, S. 2004. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des „dual compartment“ Proteins Raver1. *Diplomarbeit*.
- Fan, X.C., and Seitz, J.A. 1998. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 95:15293–15298.

Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. and Beach, D. 1994. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* 22:1502-3.

Fribourg, S., Gatfield, D., Izaurralde, E. and Conti, E. 2003. A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. *Nat Struct Biol.* 10:433-9.

Garcia-Blanco, M.A., Jamison, S.F. and Sharp, P.A. 1989. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev.* 3:1874-86.

Geiger, B., Volk, T., Volberg, T. and Bendori, R. 1987. Molecular interactions in adherens-type contacts. *J Cell Sci Suppl.* 8:251-72.

Ghetti, A., Pinol-Roma, S., Michael, W.M., Morandi, C. and Dreyfuss, G. 1992. hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res.* 20:3671-8.

Gimona, M., Lando, Z., Dolginov, Y., Vandekerckhove, J., Kobayashi, R., Sobieszek, A. and Helfman, D.M. 1997. Ca²⁺-dependent interaction of S100A2 with muscle and nonmuscle tropomyosins. *J Cell Sci.* 110:611-21.

Gonsior, S.M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen, H. 1999. Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci.* 112:797-809.

Gooding, C., Kemp, P. and Smith, C.W. 2003. A novel polypyrimidine tract-binding protein paralog expressed in smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 278:15201-7.

Gooding, C., Roberts, G.C., Moreau, G., Nadal-Ginard, B. and Smith, C.W. 1994. Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon. *EMBO J.* 13:3861-72.

Gooding, C., Roberts, G.C. and Smith, C.W. 1998. Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *RNA.* 4:85-100.

Gossen, M. and Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mamalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5547-51.

- Greene, L.A. and Tischler, A.S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:2424-8.
- Gromak, N., Rideau, A., Southby, J., Scadden, A.D., Gooding, C., Huttelmaier, S., Singer, R.H. and Smith, C.W. 2003. The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing. *Embo J*. 22:6356-64.
- Harvey, D.M. and Levine, A.J. 1991. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev*. 5:2375-85.
- Hauser, W., Knobloch, K.P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U. and Zimmer, M. 1999. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:8120-5.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R.H., Lottspeich, F., Jockusch, B.M., Scheer, U., Hauber, J. and Dabauvalle, M.C. 2001. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol*. 152:895-910.
- Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H. and Hirohashi, S. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol*. 140:1383-93.
- Hu, P., Wu, S. and Hernandez, N. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev*. 18:3010-5.
- Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. and Spector, D.L. 1997. The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus. *J Cell Biol*. 137:965-74.
- Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. and Spector, D.L. 1998. The perinucleolar compartment and transcription. *J Cell Biol*. 143:35-47.
- Huttelmaier, S., Illenberger, S., Grosheva, I., Rudiger, M., Singer, R.H. and Jockusch, B.M. 2001. Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol*. 155:775-86.

Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dictenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J. and Singer, R.H. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*. 438:512-5.

Jensen, K.B., Dredge, B.K., Stefani, G., Zhong, R., Buckanovich, R.J., Okano, H.J., Yang, Y.Y. and Darnell, R.B. 2000. Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron*. 25:359-71.

Jin, W., McCutcheon, I.E., Fuller, G.N., Huang, E.S. and Cote, G.J. 2000. Fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors. *Cancer Res*. 60:1221-4.

Jockusch, B.M., Brown, D.F. and Rusch, H.P. 1971. Synthesis and some properties of an actin-like nuclear protein in the slime mold *Physarum polycephalum*. *J Bacteriol*. 108:705-14.

Jockusch, B.M., Huttelmaier, S. and Illenberger, S. 2003. From the nucleus toward the cell periphery: a guided tour for mRNAs. *News Physiol Sci*. 18:7-11.

Kamath, R.V., Leary, D.J. and Huang, S. 2001. Nucleocytoplasmic shuttling of polypyrimidine tract-binding protein is uncoupled from RNA export. *Mol Biol Cell*. 12:3808-20.

Kasashima, K., Terashima, K., Yamamoto, K., Sakashita, E. and Sakamoto, H. 1999. Cytoplasmic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation. *Genes Cells*. 4:667-83.

Keene, J.D. 1999. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5-7.

Kielkopf, C.L., Lucke, S. and Green, M.R. 2004. U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev*. 18:1513-26.

Kim, V.N. and Dreyfuss, G. 2001. Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events. *Mol Cells*. 12:1-10.

Kim, V.N., Yong, J., Kataoka, N., Abel, L., Diem, M.D. and Dreyfuss, G. 2001. The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J*. 20:2062-8.

- Klebe, R.J., Chen, T. and Ruddle, F.H. 1970. Controlled production of proliferating somatic cell hybrids. *J Cell Biol.* 45:74-82.
- Kleinhenz, B., Fabienke, M., Swiniarski, S., Wittenmayer, N., Kirsch, J., Jockusch, B.M., Arnold, H.H. and Illenberger, S. 2005. Raver2, a new member of the hnRNP family. *FEBS Lett.* 579:4254-4258.
- Krecic, A.M., and Swanson, M.S. 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 11:363-71.
- Kukalev, A., Nord, Y., Palmberg, C., Bergmann, T. and Percipalle, P. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nature Structural & Molecular Biology.* 12:238-244.
- LaBranche, H. Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M.R., Wellinger, R.J. and Chabot, B. 1998. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet.* 19:199-202.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B.W., Perriard, J.C. and Ehler, E. 2002. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci.* 115:4925-36.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P. and Gertler, F.B. 1999. Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron.* 22:313-25.
- Lau, C.K., Diem, M.D., Dreyfuss, G. and Van Duyne, G.D. 2003. Structure of the Y14-Magoh core of the exon junction complex. *Curr Biol.* 13:933-41.
- Lawrence, J.B. and Singer, R.H. 1986. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell.* 45:407-15.
- Levi, A., Eldridge, J.D. and Paterson, B.M. 1985. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science.* 229:393-5.

- Lewandoski, M., Wassarman, K.M. and Martin, G.R. 1997. Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr Biol.* 7:148-51.
- Li, B. and Yen, T.S. 2002. Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem.* 277:10306-14.
- Lillevali, K., Kulla, A. and Ord, T. 2001. Comparative expression analysis of the genes encoding polypyrimidine tract binding protein (PTB) and its neural homologue (brPTB) in prenatal and postnatal mouse brain. *Mech Dev.* 101:217-20.
- Liu, H., Zhang, W., Reed, R.B., Liu, W. and Grabowski, P.J. 2002. Mutations in RRM4 uncouple the splicing repression and RNA-binding activities of polypyrimidine tract binding protein. *RNA.* 8:137-49.
- Lou, H., Gagel, R.F. and Berget, S.M. 1996. An intron enhancer recognized by splicing factors activates polyadenylation. *Genes Dev.* 10:208-19.
- Maris, C. Dominguez, C. and Allain, F.H. 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 272:2118-31.
- Markovtsov, V., Nikolic, J.M., Goldman, J.A., Turck, C.W., Chou, M.Y. and Black, D.L. 2000 Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol.* 20:7463-79.
- Matera, A.G., Frey, M.R., Margelot, K. and Wolin, S.L. 1995. A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol.* 129:1181-93.
- Menzies, A.S., Aszodi, A., Williams, S.E., Pfeifer, A., Wehman, A.M., Goh, K.L., Mason, C.A., Fassler, R. and Gertler, F.B. 2004. Mena and vasodilator-stimulated phosphoprotein are required for multiple actin-dependent processes that shape the vertebrate nervous system. *J Neurosci.* 24:8029-38.
- Michael, W.M., Choi, M. and Dreyfuss, G. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell.* 83:415-22.

- Mills, M., Yang, N., Weinberger, R., Vander Woude, D.L., Beggs, A.H., Easteal, S. and North, K. 2001. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet.* 10:1335-46.
- Morris, E.J., and Fulton, A.B. 1994. Rearrangement of mRNAs for costamere proteins during costamere development in cultured skeletal muscle from chicken. *J Cell Sci.* 107:377-86.
- Mulligan, G.J., Guo, W., Wormsley, S. and Helfman, D.M. 1992. Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA. *J Biol Chem.* 267:25480-7.
- Nakielnny, S. and Dreyfuss, G. 1997. Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 9:420-9.
- Nakielnny, S. and Dreyfuss, G. 1996. The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J Cell Biol.* 134:1365-73.
- Newbold, R.F. 1997. Genetic control of telomerase and replicative senescence in human and rodent cells. *Ciba Found Symp.* 211:177-89.
- Oberstrass, F.C., Auweter, S.D., Erat, M., Hargous, Y., Henning, A., Wenter, P., Reymond, L., Amir-Ahmady, B., Pitsch, S., Black, D.L. and Allain, F.H. 2005. Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science.* 309:2054-7.
- Oh, Y.L., Hahm, B., Kim, Y.K., Lee, H.K., Lee, J.W., Song, O., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Nomoto, A. and Jang, S.K. 1998. Determination of functional domains in polypyrimidine-tract-binding protein. *Biochem J.* 331:169-75.
- Olson, T.M., Illenberger, S., Kishimoto, N.Y., Huttelmaier, S., Keating, M.T. and Jockusch, B.M. 2002. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 105:431-7.
- Pederson, T. and Aebi, U. 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol.* 140:3-9.
- Percipalle, P., Zhao, J., Pope, B., Weeds, A., Lindberg, U. and Daneholt, B. 2001. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol.* 153:229-36.

Percipalle, P., Jonsson, A., Nashchekin, D., Karlsson, C., Bergman, T., Guialis, A. and Daneholt, B. 2002. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res.* 30:1725-34.

Perez, I., McAfee, J.G. and Patton, J.G. 1997 (a). Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry.* 36:11881-90.

Perez, I., Lin, C.H., McAfee, J.G. and Patton, J.G. 1997 (b). Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo. *RNA.* 3:764-78.

Philimonenko, V.V., Zhao, J., Iben, S., Dingova, H., Kysela, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W.A., de Lanerolle, P., Hozak, P. and Grummt, I. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol.* 6:1165-72.

Pilipenko, E.V., Viktorova, E.G., Guest, S.T., Agol, V.I. and Roos, R.P. 2001. Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *Embo J.* 20:6899-908.

Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature.* 355:730-2.

Pollard, T.D. and Borisy, G.G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-65.

Polydorides, A.D., Okano, H.J., Yang, Y.Y., Stefani, G. and Darnell, R.B. 2000. A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6350-5.

Price, G.J., Jones, P., Davison, M.D., Patel, B., Bendori, R., Geiger, B. and Critchley, D.R. 1989. Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem J.* 259:453-61.

Rajagopalan, L.E., Westmark, C.J., Jarzembowski, J.A. and Malter, J.S. 1998. hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA. *Nucleic Acids Res.* 26:3418-23.

Robida, M.D. and Singh, R. 2003. Drosophila polypyrimidine-tract binding protein (PTB) functions specifically in the male germline. *EMBO J.* 22:2924-33.

Romanelli, M.G., Lorenzi, P. and C. Morandi, C. 2000 Organization of the human gene encoding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein type I (hnRNP I) and characterization of hnRNP I related pseudogene. *Gene*. 255:267-72.

Romanelli, M.G., Weighardt, F., Biamonti, G., Riva, S. and Morandi, C. 1997. Sequence determinants for hnRNP I protein nuclear localization. *Exp Cell Res*. 235:300-4.

Rudiger, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. 1997. Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques*, 23:96-7.

Sahlas, D.J., Milankov, K., Park, P.C. and deBoni, U. 1993. Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *J Cell Sci*. 105:347-57.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA-sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463-67

Scacheri, P.C., Crabtree, J.S., Novotny, E.A., Garrett-Beal, L., Chen, A., Edgemon, K.A., Marx, S.J., Spiegel, A.M., Chandrasekharappa, S.C. and Collins, F.S. 2001. Bidirectional transcriptional activity of PGK-neomycin and unexpected embryonic lethality in heterozygote chimeric knockout mice. *Genesis*. 30:259-63.

Shamoo, Y., Abdul-Manan, N. and Williams, K.R. 1995. Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up. *Nucleic Acids Res*. 23:725-8.

Shav-Tal, Y. and Singer, R.H. 2005. RNA localization. *J Cell Sci*. 118:4077-81

Shyu, A.B. and Wilkinson, M.F. 2000. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell*. 102:135-8.

Singh, R. and Valcarcel, J. 2005. Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 12:645-53.

Singh, R., Valcarcel, J. and Green, M.R. 1995. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science*. 268:1173-6.

Siomi, H. and Dreyfuss, G. 1997. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 7:345-53.

Southby, J., Gooding, C. and Smith, C.W. 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol.* 19:2699-711.

Spellman, R., Rideau, A., Matlin, A., Gooding, C., Robinson, F., McGlincy, N., Grellscheid, S.N., Southby, J., Wollerton, M. and Smith, C.W. 2005. Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors. *Biochem Soc Trans.* 33:457-60.

Stefl, R. and Allain, F.H. 2005. A novel RNA pentaloop fold involved in targeting ADAR2. *RNA.* 11:592-7.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189:113-30.

Swanson, M.S. and Dreyfuss, G. 1988. Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. *Mol Cell Biol.* 8:2237-41.

Swiniarski, S. und Illenberger, S. 2005. Biochemische Analysen von Raver2 einem neuen Mitglied der „heterogeneous nuclear ribonucleoprotein“-Familie. *Diplomarbeit.*

Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. and Darnell, R.B. 2003. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science.* 302:1212-5.

Valcarcel, J. and Gebauer, F. 1997. Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol.* 7:705-8.

Villarejo, M.R. and Zabin, I. 1974. Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J.Bacteriol.* 120:466-74.

Wagner, E.J. and M.A. Garcia-Blanco. 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol.* 21:3281-8.

- Wan, L., Kim, J.K., Pollard, V.W. and Dreyfuss, G. 2001. Mutational definition of RNA-binding and protein-protein interaction domains of heterogeneous nuclear RNP C1. *J Biol Chem.* 276:7681-8.
- Wendland, M. und Arnold, H.H. 2002. Untersuchungen zur Funktion des Zytoskelett assoziierten Protein Raver1. *Diplomarbeit.*
- Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S.C., Fedorov, A.A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C., Kraft, D., Jockusch, B. and Valenta, R. 1996. Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 271:29915-21.
- Witt, S., Zieseniss, A., Fock, U., Jockusch, B.M. and Illenberger, S. 2004. Comparative biochemical analysis suggests that vinculin and metavinculin cooperate in muscular adhesion sites. *J Biol Chem.* 279:31533-43.
- Wollerton, M.C., Gooding, C., Robinson, F., Brown, E.C., Jackson, R.J. and Smith, C.W. 2001. Differential alternative splicing activity of isoforms of polypyrimidine tract binding protein (PTB). *RNA.* 7:819-32.
- Worbs, T. und Arnold, H.H. 2001. Das murine Raver1-Gen: Analyse der genomischen Organisation und Klonierung eines Knock-Out-Konstrukts. *Studienarbeit.*
- Xie, J., Lee, J.A., Kress, T.L., Mowry, K.L. and Black, D.L. 2003. Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:8776-81.
- Yaffe, D. and Saxel, O. 1977. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 7:159-66.
- Zemljic-Harpf, A.E., Ponrartana, S., Avalos, R.T., Jordan, M.C., Roos, K.P., Dalton, N.D., Phan, V.Q., Adamson, E.D. and Ross, R.S. 2004. Heterozygous inactivation of the vinculin gene predisposes to stress-induced cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 165:1033-44.
- Zieseniß, A., Jockusch B.M. und Illenberger, S. 2005. Biochemische Charakterisierung des „dual compartment“-Proteins Raver1: Neue Aspekte der Ligandenbindung und Regulation. *Dissertation.*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch danke ich für ihre fachliche Unterstützung sowie für ihr reges Interesse an meiner Arbeit. Die optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe und der wissenschaftliche Gestaltungsfreiraum, den sie ihren Mitarbeitern einräumt, haben zudem zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Hans Henning Arnold möchte ich mich für das stetige Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und für seine Diskussionsfreudigkeit bedanken und natürlich auch für die freundliche Übernahme des Koreferat.

Frau PD Dr. Susanne Illenberger danke ich zum einem für die Teilnahme an der Prüfungskommission und zum anderen möchte ich mich für ihre stete Diskussionsbereitschaft, wissenschaftlichen Ratschläge und die Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken, sowie für die persönlichen Ermutigungen bei dieser Arbeit und den Beistand, den sie mir entgegengebracht hat. Von unschätzbarem Wert war ihre Unterstützung insbesondere während der Endphase dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Norbert Käufer danke ich ebenfalls für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Joachim Kirsch und Frau Dr. Nina Wittenmayer danke ich für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit bei ihnen in Heidelberg primäre Ratten-Neuronen zu präparieren.

Dr. Martin Rothkegel möchte ich für seine Hilfsbereitschaft bei allen Belangen des Laboralltags danken.

Ein großes Dankeschön gebührt Sabine Buchmeier für die viele Arbeit und Mühen bei der Herstellung Raver2-spezifischer Antikörper und deren Charakterisierung, sowie für die Produktion der vielen, vielen Antikörper.

Dr. Anke Zieseniß danke ich für die Aufreinigung von Raver1-Protein und die vielen kleinen Tipps bei den Proteinbiochemischen-Analysen.

Für ihre Unterstützung im Kampf gegen die Bürokratie möchte ich mich bei Frau Ilona Demesvary bedanken.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zellbiologie möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken. Bei Tania Messerschmidt, Carmen Wucherpennig und Tina Geisler möchte ich mich für die vielen Dinge bedanken die den Laboralltag am laufen halten und auch für die vielen beantworteten Fragen. Besonders möchte ich mich bei der „neuen“ Truppe, bei Stefania Rosan, Kai Murk, Guido Herzberg und Marén Siemon für die amüsanten Mittagspausen bedanken und dafür, dass der Spaß neben dem Frust nicht verloren geht.

Vielen Dank allen meinen Laborgenossen aus Raum 156 und das waren viele. Besonders möchte ich mich bei meinen ehemaligen Laborgenossen Dr. Marcell Lederer und Dr. Ulrike Fock danken, dafür dass sie mir so viele Dinge gerade zum Beginn der Doktorarbeit beigebracht haben. Bei Eva Saxinger bedanke ich mich dafür, dass sie mit mir die Stellung im Labor gehalten hat und für die vielen Lösungen und die hervorragenden kompetenten Zellen, die du uns machst. Bei Sascha Swiniarski bedanke ich mich für das Leben das wieder im Labor eingezogen ist und dafür, dass du den letzten Versuch meiner Doktorarbeit gemacht hast, als ich ihn nicht mehr machen konnte.

Bei Dr. Andrea Bolte bedanke ich mich für ihre Freundschaft, die so manche Stunden erleichtert und verschönert hat.

Besonders bedanke ich mich bei Manou Fabienke, für die gemeinsame Zeit auf dem Raver-Projekt, für die hervorragende Zusammenarbeit, die vielen Diskussionsreichen Abende, die uns doch immer wieder ein Stück weiter gebracht haben. Aber am meisten möchte ich mich für deine Freundschaft bedanken, ohne die ich jetzt nicht an diesem Punkt wäre und die mir von unschätzbarem Wert ist.

Meiner Familie, meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Schwager und meinem Bruder danke ich für die Aufmunterungen und für die Hilfe, um die Kraft zu finden nicht aufzugeben und zu kämpfen gegen alle Unwidrigkeiten während der Doktorarbeit. Dennis dir danke ich für den Halt, den du mir in meinem Leben gibst, für die unermüdliche, liebevolle Unterstützung und die Freude die mir unser gemeinsames Leben bereitet.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Berenike Johanna Maria Henneberg geb. Kleinhenz
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 - 1983 Vorschule Freie Waldorfschule Frankfurt am Main
1983 - 1996 Freie Waldorfschule Frankfurt am Main
06/1992-01/1993 Schulbesuch: Michael Mount Waldorf School, Johannesburg, Südafrika

Hochschulstudium

10/1996 – 10/2001 Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
07/2000-10/2001 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch an Technischen Universität Braunschweig; Thema: "Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein und Protein-RNA Wechselwirkungen mittels des „Yeast-Two-Hybrid“ und „Yeast-Tri-Hybrid“-Systems"

Promotion

11/2001 – 04/2006 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Zoologie/Zellbiologie der Technischen Universität Braunschweig unter der Leitung von Frau Prof. Dr. B.M. Jockusch; „Vergleichende Untersuchungen zur Funktion von Raver1 und Raver2“